

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Daniela Polatová

Příprava a biochemická charakterizace proteasového inhibitoru equistatinu

Preparation and biochemical characterization of protease inhibitor equistatin

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze:

Podpis:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Michaelu Marešovi, CSc. za čas, který mi věnoval, a za trpělivost, ochotu a velmi cenné rady a náměty, které mi v průběhu vytváření této práce poskytl. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za posouzení celé práce. Můj velký dík patří také Mgr. Jaroslavu Srpovi za obětavou pomoc při zpracování praktické části této práce a také za ochotu a trpělivost s mými neustálými dotazy. Ostatním členům laboratoře děkuji za příjemné pracovní prostředí. Za poskytnutí expresního plasmidu děkuji Dr. Jongsmovi (Wageningen University & Research, Nizozemsko).

Děkuji též své rodině a blízkým za podporu, pochopení a vlídné slovo nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého dosavadního studia.

# Abstrakt

Equistatin ze sasanky koňské (*Actinia equina*) obsahuje proteinovou doménu Eqd2, která inhibuje aspartátové peptidasy, ale dosud nebyla detailně charakterizována. Rekombinantní Eqd2 byl připraven v kvasinkovém expresním systému a byl navržen protokol pro jeho chromatografickou purifikaci. Pomocí fluorescenčního inhibičního testu byla určena inhibiční specifita Eqd2, která ukázala, že je vysoce selektivním inhibitorem peptidas typu katepsinu D a pepsinu z rodiny aspartátových peptidas A1. Dále byla pomocí gelové chromatografie analyzována tvorba komplexu Eqd2-peptidasa a oligomerizace Eqd2 v roztoku. Za účelem budoucí rentgenostrukturní analýzy Eqd2 byla provedena primární analýza krystalizačních podmínek. Tato práce přináší nové významné informace o Eqd2 jako unikátním typu přirozených inhibitorů aspartátových peptidas. Lze předpokládat, že určení interakčního mechanismu Eqd2 umožní navrhovat jeho syntetická mimetika pro regulaci medicínálně významných peptidas.

*Klíčová slova:* peptidasové inhibitory, proteolytické enzymy, aktivita a inhibice enzymů, rekombinantní exprese, purifikace proteinů, krystalizace proteinů, equistatin

# Abstract

Equistatin from the sea anemone *Actinia equina* contains a protein domain Eqd2 which inhibits aspartic peptidases and has not been characterized in detail. Recombinant Eqd2 was produced in the yeast expression system, and a protocol for its chromatographic purification was designed. The inhibitory specificity of Eqd2 was determined using a fluorescence inhibition assay, showing that Eqd2 is a highly selective inhibitor of cathepsin D-like and pepsin-like aspartic peptidases of family A1. Furthermore, size exclusion chromatography was used to analyze the Eqd2-peptidase complex and Eqd2 oligomerization in solution. Initial screening of crystallization conditions for Eqd2 was performed towards its structural analysis. This work provides important new information about Eqd2 as a unique type of natural inhibitors of aspartic peptidases. Its interaction mechanism can be exploited in the development of synthetic mimetics for regulation of medically important peptidases.

*(In Czech)*

*Key words:* peptidase inhibitors, proteolytic enzymes, activity and inhibition of enzymes, recombinant expression, protein purification, protein crystallization, equistatin

# OBSAH

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam zkratek .....	9
Zkratky aminokyselin .....	12
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1. <i>Proteolytické enzymy</i> .....	13
1.2. <i>Aspartátové peptidas</i> .....	15
1.2.1. Struktura aspartátových peptidas .....	17
1.2.2. Substrátová specifita aspartátových peptidas .....	18
1.2.3. Mechanismus katalýzy aspartátových peptidas .....	20
1.2.4. Regulace aktivity aspartátových peptidas .....	22
1.2.5. Katepsin D .....	24
1.2.5.1. Biosyntéza katepsinu D .....	24
1.2.5.2. Struktura a substrátová specifita katepsinu D .....	25
1.2.5.3. Fyziologická funkce katepsinu D .....	25
1.2.5.4. Patologie spojené s katepsinem D .....	26
1.3. <i>Proteinové inhibitory peptidas</i> .....	27
1.3.1. Inhibitory aspartátových peptidas .....	27
1.3.2. Thyropiny .....	30
1.3.2.1. Thyreoglobulinová doména typu 1 .....	30
1.3.2.2. Equistatin .....	31
1.3.2.3. Equistatin jako peptidasový inhibitor .....	32
1.3.2.4. Equistatin jako proteinový insekticid .....	33
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	34
3. MATERIÁLY A POUŽITÉ METODY .....	35
3.1. <i>Materiály</i> .....	35
3.1.1. Biologický materiál .....	35
3.1.2. Chemikálie .....	35

3.1.2.1. Enzymy .....	35
3.1.2.2. Peptidové substráty .....	36
3.1.2.3. Krystalizační sady.....	36
3.1.2.4. Standardy molekulových hmotností pro SDS-PAGE.....	36
3.1.2.5. Ostatní chemikálie .....	37
3.1.3. Přístroje a vybavení .....	37
3.1.3.1. Přístroje .....	37
3.1.3.2. Komerční soupravy .....	38
3.1.3.3. Kolony a nosiče .....	38
3.1.3.4. Ostatní vybavení .....	38
<i>3.2 Metody.....</i>	<i>39</i>
3.2.1. Rekombinantní exprese v <i>Pichia pastoris</i> .....	39
3.2.2. Purifikace Eqd2.....	40
3.2.2.1. Odsolení média pomocí gelové chromatografie .....	40
3.2.2.2. Purifikace Eqd2 na iontoměničových kolonách .....	41
3.2.2.3. Purifikace Eqd2 pomocí gelové chromatografie .....	42
3.2.3. Stanovení molekulové hmotnosti pomocí gelové chromatografie.....	42
3.2.4. Stanovení molekulové hmotnosti hmotnostní spektrometrií.....	43
3.2.5. Elektroforetické metody .....	43
3.2.5.1. Acetonová precipitace proteinů .....	43
3.2.5.2. Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	43
3.2.5.3. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.....	44
3.2.5.4. Přenos proteinů na PVDF membránu a analýza N-koncové aminokyselinové sekvence .....	44
3.2.6. Stanovení koncentrace proteinu .....	44
3.2.7. Aminokyselinová analýza .....	45
3.2.8. Kinetická měření aktivity enzymu .....	45
3.2.8.1. Analýza inhibice enzymů.....	45
3.2.8.2. Určení hodnoty IC <sub>50</sub> .....	47
3.2.9. Příprava komplexu Eqd2 s peptidasou .....	47

3.2.10. Krystalizace Eqd2 .....	47
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>49</b>
4.1. Rekombinantní exprese Eqd2 v <i>Pichia pastoris</i> .....	49
4.2. Chromatografická purifikace Eqd2.....	50
4.2.1. Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie.....	51
4.2.2. Purifikace Eqd2 na iontoměničových kolonách .....	52
4.2.2.1 Purifikace Eqd2 na koloně Mono S.....	52
4.2.2.2. Purifikace Eqd2 na koloně Mono Q.....	54
4.2.2.3. Purifikace Eqd2 na koloně Q-Sepharose.....	55
4.2.2.4. Purifikace Eqd2 pomocí gelové chromatografie .....	57
4.3. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2.....	59
4.3.1. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 gelovou chromatografií.....	59
4.3.2. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI .....	61
4.4. Analýza inhibiční specifity Eqd2.....	62
4.4.1. Kinetické měření inhibice vybraných enzymů s Eqd2.....	62
4.4.2. Stanovení inhibiční konstanty IC <sub>50</sub> .....	64
4.5. Příprava komplexu IrCD s Eqd2.....	65
4.6. Krystalizace Eqd2 .....	67
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>69</b>
<b>6. ZÁVĚRY .....</b>	<b>72</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERTURY .....</b>	<b>73</b>



## Seznam zkratek

Abz	kyselina aminobenzoová
Amc	7-amino-4-methylkumarin
APS	peroxodisíran amonný
ATBI	"alkaloid thermofilic Bacillus inhibitor"
BCA	kyselina bicinchoninová
BMG	minimální glycerolové médium ("buffered minimal glycerol")
BMM	minimální metanolové médium ("buffered minimal methanol")
BPTI	inhibitor trypsinu z hovězí sleziny ("bovine pankreas trypsin inhibitor")
BSA	hovězí sérový albumin ("bovine serum albumin")
Cbz	benzyloxykarbonyl
CME	"celulose mixed ester"
CV	objem kolony ("column volume")
Da	Dalton
Dabcyl	4-(4-dimethylaminofenyl)diazenylbenzoová kyselina
DISC	"death-inducing signalling complex"
Dnp	2,4-dinitrofenyl
DTT	dithiotreitol
EDANS	5-((2-aminoethyl)amino)naftalen-1-sulfonová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraacetát
Eqd1	doména 1 equistatinu
Eqd2	doména 2 equistatinu
Eqd3	doména 3 equistatinu
FPLC	"fast protein liquid chromatography"
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie ("fluorescence resonance energy transfer")
h	hodina
hCD	lidský katepsin D
HIV	virus lidské imunodeficiency („human immunodeficiency virus“)

IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru, při které je aktivita enzymu 50 %
IGFBP	„insulin-like growth factor binding protein“
IrCD	kathepsin D z klíštěte obecného
K <sub>AV</sub>	rozdělovací koeficient
K <sub>i</sub>	inhibiční konstanta
k <sub>kat</sub>	katalytická konstanta
K <sub>M</sub>	Michaelisova konstanta
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LdCD	kathepsin D z mandelinky bramborové
LDL	lipoprotein o nízké hustotě ("low-density lipoprotein")
M	molekulová hmotnost
MALDI	"matrix-assisted laser desorption/ionization"
mAU	tisícina absorbancí jednotky („milli-absorbation unit“)
Mca	(7-methoxykumarin-4-yl)acetyl
MES	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
MHC	hlavní histokompatibilní komplex ("major histocompatibility complex")
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MWCO	membrána s póry o definované velikosti ("molecular weight cut-off")
NMR	nukleární magnetická rezonance
NV	nenavázaná frakce chromatografie
OD	optická denzita
OVA	ovalbumin
PDB	„protein data bank“
PDI	inhibitor kathepsinu D z brambor ("potato cathepsin D inhibitor")
PEG	polyethylenglykol
pI	izoelektrický bod
PI-3	pepsin inhibitor 3
pK	disociační konstanta
PM	promytá frakce chromatografie

PVDF	polyvinylidifluorid
RFU	relativní fluorescenční jednotky
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SQAPI	"squash aspartic proteinase inhibitor"
STI	sójový inhibitor trypsinu ("soybean trypsin inhibitor")
Suc	sukcinyl
TEMED	N, N, N', N' - tetraethylenmethylen-diamin
TIMP	tkáňový inhibitor metalopeptidas ("tissue inhibitor of metalloproteinases")
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomehtan
UV	ultra fialové světlo ("ultra-violet")
V <sub>0</sub>	mrtvý objem kolony
V <sub>e</sub>	eluční objem
V <sub>t</sub>	celkový objem kolony
YNB	složka média pro expresi v kvasinkách <i>Pichia pastoris</i> ("yeast nitrogen base")

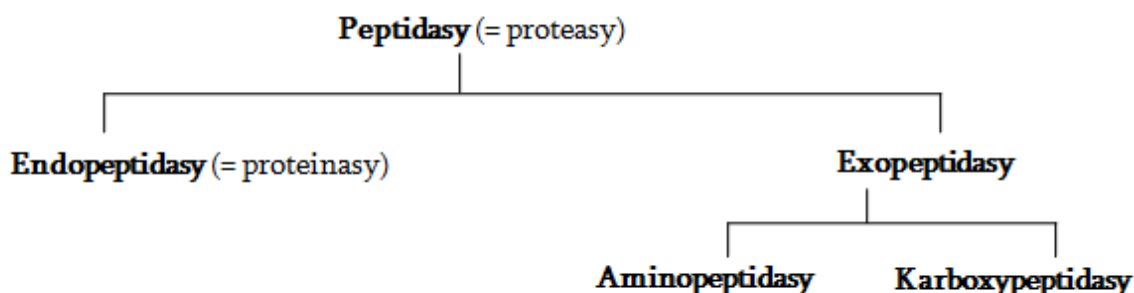
## Zkratky aminokyselin

<b>A</b>	Ala	alanin
<b>C</b>	Cys	cystein
<b>D</b>	Asp	kyselina asparagová
<b>E</b>	Glu	kyselina glutamová
<b>F</b>	Phe	fenylalanin
<b>F'</b>	Nph	4-nitrofenylalanin
<b>G</b>	Gly	glycin
<b>H</b>	His	histidin
<b>I</b>	Ile	isoleucin
<b>K</b>	Lys	lysin
<b>L</b>	Leu	leucin
<b>M</b>	Met	methionin
<b>N</b>	Asn	asparagin
<b>nL</b>	Nle	norleucin
<b>P</b>	Pro	prolin
<b>Q</b>	Gln	glutamin
<b>R</b>	Arg	arginin
<b>S</b>	Ser	serin
<b>T</b>	Thr	threonin
<b>V</b>	Val	valin
<b>W</b>	Trp	tryptofan
<b>Y</b>	Tyr	tyrosin
	Sta	statin
	Iva	isovalin

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

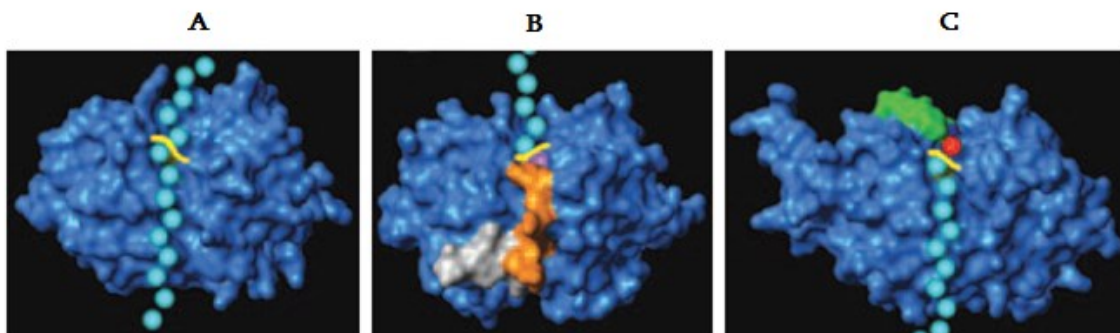
## 1.1. Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy jsou schopné hydrolyticky štěpit peptidovou vazbu v peptidech a proteinech procesem, který se nazývá proteolýza. Tyto enzymy se vyskytují u virů a všech živých organismů (bakterie, prvoci, rostliny, živočichové), kde se účastní široké škály biochemických pochodů (např. trávení, koagulační kaskády). Správný průběh proteolýzy je zásadní a je zajištěn přísnou regulací, která se odehrává na několika úrovních<sup>1</sup>. V literatuře lze proteolytické enzymy najít pod označením „proteasy“, „proteinasy“ nebo „peptidasy“. Tato nomenklatura vychází z historických pojmenování enzymů na základě jejich substrátové specifity, v dnešní době se však doporučuje používat název „peptidasa“ pro všechny enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu<sup>2</sup>.



**Obr 1.1. Rozdělení proteolytických enzymů (peptidas). Převzato a upraveno z <sup>2</sup>.**

Peptidasy je možno dle místa štěpení substrátu rozdělit na endopeptidasy (štěpí uprostřed polypeptidového řetězce, např. trypsin, pepsin) a exopeptidasy (štěpí na konci řetězce). Exopeptidasy lze dále dělit na aminopeptidasy štěpící z N-konce peptidového řetězce (např. katepsin H), a karboxypeptidasy štěpící z C-konce peptidového řetězce (např. katepsin X; viz obr. 1.1. a 1.2., str. 14). Exopeptidasy se dělí podle počtu aminokyselinových zbytků, které odštěpují z konce peptidového řetězce - např. katepsin B je karboxydipeptidasa odštěpující dipeptidy z C-konce.



**Obr. 1.2. Dělení peptidas dle místa hydrolytického štěpení polypeptidového řetězce.** Na obrázku jsou znázorněny zástupci jednotlivých typů peptidas z rodiny cysteinových peptidas. (A) *Endopeptidasa katepsin L*; (B) *Aminopeptidasa katepsin H*; (C) *Karboxypeptidasa katepsin X*. Světle modře je znázorněn štěpený polypeptidový řetězec, žlutá znázorňuje místo štěpení. Koncové aminokyseliny substrátu jsou zobrazeny fialově (N-konec) nebo červeně (C-konec). Tmavě modře je znázorněna peptidasa jako povrchový model. Strukturní úseky zajišťující exopeptidasovou aktivitu jsou zobrazeny, oranžově (mini-řetězec katepsinu H) nebo zeleně (mini-smyčka katepsinu X). Převzato a upraveno z<sup>3</sup>

Proteolytické enzymy lze podle mechanismu katalýzy štěpení rozdělit do několika tříd. Jedná se o peptidasy aspartátové, cysteinové, threoninové, glutamátové, serinové, asparaginové, peptidasy se smíšenou funkcí a metalopeptidasy. U některých peptidas není mechanismus štěpení peptidové vazby dosud objasněn<sup>4</sup>. Tato variabilita je důsledkem evolučního přizpůsobení peptidas široké škále podmínek (redukční potenciál, pH, apod.), které jsou rozdílné v rámci organismů a kompartmentů. Jednotlivé třídy peptidas se liší stavbou aktivního centra, které řídí mechanismus štěpení peptidové vazby. Aspartátové, asparaginové, a glutamátové peptidasy využívají k nukleofilnímu ataku na peptidovou vazbu substrátu aktivovanou molekulu vody, která reaguje se dvěma aspartátovými zbytky (aspartátové peptidasy; více viz kap.1.2., str. 15), se zbytky aspartátu a asparaginu (asparaginové peptidasy) nebo se zbytkem glutamátu (glutamátové peptidasy). Metalopeptidasy aktivují molekulu vody iontem kovu (obvykle zinku nebo manganu). Serinové, threoninové a cysteinové peptidasy štěpí peptidovou vazbu pomocí hydroxylové, resp. thiolové skupiny příslušné aminokyseliny ve svém aktivním centru<sup>4</sup>. Aktuální přehled všech dosud popsanych peptidas je k dispozici

v databázi proteolytických enzymů a jejich inhibitorů MEROPS<sup>4</sup>. Aminokyselinové složení aktivního centra jednotlivých tříd peptidas je shrnuto v Tab. 1.1.

**Tab. 1.1. Rozdělení hlavních tříd peptidas dle katalytického mechanismu a stavby aktivního centra. Převzato a upraveno z <sup>4</sup>.**

Třída peptidas	Struktura aktivního centra	Zástupce (klan/rodina)
aspartátové	Asp; Asp	pepsin A (AA/A1)
serinové	His; Asp; Ser	chymotrypsin (PA/S1)
threoninové	Thr; Ser; His; Asp	gama-glutamyltransferasa (PB/T3)
cysteinové	His; Cys; Asn	papain (CA/C1)
glutamátové	Glu; Gln	scytalidoglutamátová peptidasa (GA/G1)
asparaginové	Asp; Asn	peptidová lyasa nodaviru (NA/N1)
metalopeptidasy	ion $Zn^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Ca^{2+}$	thermolysin (MA/M4)

Dle evoluční příbuznosti a sekvenční homologie je možné peptidasy dělit do klanů a rodin. Rodiny zahrnují peptidasy vykazující signifikantní homologii v primární sekvenci. V jednom klanu jsou rodiny peptidas, které vzešly ze stejného evolučního předka (z jednoho původního genu), ale již natolik divergovaly, že homologie mezi nimi je patrná zejména ve 3D struktuře. Klany se označují dvoupísmennými zkratkami, kde první písmeno značí katalytický mechanismus zahrnutých rodin (např. A pro aspartátové peptidasy, C pro cysteinové peptidasy)<sup>4</sup>.

Při analýze lidského a myšího genomu bylo nalezeno okolo 600 peptidas, což jsou přibližně 2 % celého genomu. Většina z těchto peptidas se vyskytuje u více druhů živých organismů, jsou tzv. ortologní<sup>5,6</sup>.

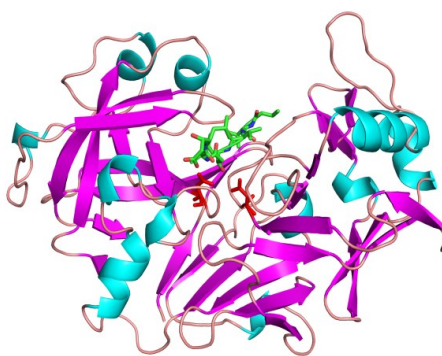
## 1.2. Aspartátové peptidasy

Aspartátové peptidasy jsou rozšířenou skupinou proteolytických enzymů. Zástupce těchto peptidas můžeme nalézt jak u virů (např. HIV proteasa), bakterií a prvoků (např. plasmepsin), tak také u rostlin a živočichů (např. katepsin D, pepsin). U živočichů a masožravých rostlin<sup>7</sup> se obvykle účastní trávení potravy, u rostlin zajišťují hydrolytické štěpení proteinů v semenech při klíčení, chrání před patogeny či se účastní

opylení<sup>8</sup>. U retrovirů, kde jsou proteiny často syntetizovány ve formě polyproteinů, jsou jednotlivé funkční proteiny vyštěpovány retrovirální aspartátovou peptidasou, jako je tomu např. u viru HIV, kde působí aspartátová HIV proteasa<sup>9</sup>.

Na základě strukturní homologie jsou aspartátové peptidasy rozděleny do pěti klanů a šestnácti rodin<sup>4</sup>. Do rodiny A1 patří asi nejznámější aspartátová peptidasa pepsin (obr. 1.3.), proto se tato rodina nazývá pepsinová<sup>4</sup>. Do stejné rodiny se řadí i katepsin D<sup>4</sup>. Další velmi dobře prozkoumaná peptidasa je HIV proteasa, která patří do rodiny A2<sup>4</sup>.

Aspartátové peptidasy jsou enzymy, které ve svém aktivním centru obsahují dva zbytky kyseliny asparagové. Obvykle se jejich molekulová hmotnost pohybuje v rozmezí 35–40 kDa a mívají kyselé pH optimum, jsou však známy i takové aspartátové peptidasy, které působí v oblasti neutrálního pH (např. renin). Jsou velmi citlivé k pepstatinu, který funguje jako silný kompetitivní inhibitor<sup>9</sup>. Všechny dosud popsané aspartátové peptidasy jsou endopeptidasy a není zcela zřejmé, proč by jejich mechanismus katalýzy nemohl fungovat i pro exopeptidasy<sup>10</sup>.



**Obr. 1.3. Prostorová struktura pepsinu v komplexu s inhibitorem pepstatinem. Aspartátové zbytky v aktivním centru jsou znázorněny červeně. Pepstatin je zobrazen zeleně. PDB: 1PSO, upraveno v programu PyMoL.**



### 1.2.1. Struktura aspartátových peptidas

U eukaryotických organismů jsou aspartátové peptidasy z pepsinové rodiny A1 obvykle monomerní enzymy tvořené přibližně 330 aminokyselinovými zbytky. Vykazují velkou míru homologie jak na úrovni primární, tak na úrovni terciární struktury. Vazebné místo pro substrát je tvořeno širokou dutinou se dvěma aspartátovými zbytky (na pozicích 32 a 215, číslováno podle pepsinu). V okolí aspartátových zbytků se vyskytuje triáda Asp-Thr-Gly (tzv. DTG motiv), sekvence v okolí tohoto motivu bývá u jednotlivých peptidas rovněž obdobná. Dále jsou konzervované pozice disulfidických můstků a tyrosin na pozici 75 (viz obr. 1.4., str. 18). Tyr75 je součástí flexibilní smyčky (zvané „chlopeň“), která částečně zakrývá aktivní centrum enzymu a je důležitá pro substrátovou specifitu<sup>11</sup>. Peptidasy pepsinové rodiny tvoří dvě strukturně podobné domény, což naznačuje společného evolučního předka obou domén. U něj pravděpodobně došlo k duplikaci daného genu za vzniku monomerní architektury<sup>12</sup>. Mezi doménami je umístěna dutina aktivního centra, které je schopné vázat substrát o velikosti oktapeptidu v natažené konformaci  $\beta$ -skládaného listu.

Katepsin D tvoří čtyři disulfidické můstky, což je o jeden můstek víc (v pozici Cys27-Cys96) oproti ostatním pepsinovým peptidasám. Další výjimkou je také N-glykosylace katepsinu D (v pozici Asn70 a Asn199)<sup>13</sup> a katepsinu E (v pozici Asn70)<sup>14</sup>, která slouží ke správnému transportu enzymu do buněčných organel (více v kap. 1.2.5.1., str. 24)<sup>10</sup>.

	2	3	4	8	21	22	
	78901234567890123456	123456789012	012345678901234				
1	TIGIGTPAQDFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	VSITVTGSGMTG	COAIVDTGTSLLTGF				<i>Homo sapiens</i> pepsin A.
2	TISIGTPQODESVVFDTGSSNLWVPSVYCK	VTIAVTGSGMG	COAIVDTGTSLLVMP				<i>Gallus gallus</i> pepsin A.
3	TISIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYOT	ISIEVTGDMAG	COAIVDTGTSLLVAGP				<i>G. gallus</i> embryonic pepsin.
4	TISIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	INIVTGSGRMG	COAIVDTGTSLLTGF				<i>Oryzotagus cuniculus</i> pepsin F.
5	ESIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYQ	ESLQVGSGLTG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>H. sapiens</i> gastricsin.
6	TISIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYOT	ESIQVGSGLTG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>H. sapiens</i> cathepsin E.
7	TISIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYOT	ESIQVGSGLTG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>O. cuniculus</i> cathepsin E.
8	KIYLTGTPQDEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCK	ISIEVTGSGMG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>Bos taurus</i> chymosin.
9	KIYLTGTPQDEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCK	ISIQVGSGLTG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>Sus scrofa</i> chymosin.
10	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	FTIEVTGSRVKG	CEVVVDGSSFTSAP				<i>Mus musculus</i> submandibular renin.
11	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	LTLEVTGTVSG	CEVVVDGSSFTSAP				<i>H. sapiens</i> renin.
12	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	FTIEVTGSRVKG	CEVVVDGSSFTSAP				<i>H. sapiens</i> cathepsin D.
13	ATICTGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Aedes aegypti</i> lysosomal aspartic endopept.
14	ITKIGN--QNFVTFVFTGSSNLWVPSVYCS	F--VDTGSAVG	TOAIVDTGTSLLTGP				<i>Blattella germanica</i> lysos. asp. endopept.
15	ITKIGN--QNFVTFVFTGSSNLWVPSVYCS	IKLIVGTGKMG	COAIVDTGTSLLTGP				<i>Equus caballus</i> placental aspartic endopept.
16	NHIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Ovis aries</i> pregnancy-associated glycoprot.
17	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> saccharopepsin.
18	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>S. cerevisiae</i> barrierpepsin.
19	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>S. cerevisiae</i> yapsin 1.
20	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>S. cerevisiae</i> yapsin 2.
21	KMEIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>S. cerevisiae</i> yir039C protein.
22	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Candida albicans</i> candidapepsin 1.
23	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>C. albicans</i> candidapepsin 4.
24	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>C. albicans</i> candidapepsin 7.
25	KVSIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Candida parapsilosis</i> candidapepsin 1.
26	RVSIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>C. parapsilosis</i> candidapepsin 1.
27	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Candida tropicalis</i> candidapepsin 1.
28	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> asp. endopept.
29	PVSIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Rhizomucor miehei</i> mucorpepsin.
30	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Aspergillus niger</i> pepsin E.
31	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Rhizopus niveus</i> rhizopuspepsin 1.
32	PVOIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Cryphonectria parasitica</i> endothepepsin.
33	PVOIGTPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Glomerella cingulata</i> secreted aspartic pept.
34	PVTIGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Penicillium janthinellum</i> penicillopepsin.
35	PVTIGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Aspergillus saitoi</i> aspergillopepsin I.
36	PVKIGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Aspergillus fumigatus</i> aspergillopepsin F.
37	PVTIGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Aspergillus awamori</i> aspergillopepsin I.
38	NVIGTGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Polyporus tulipiferae</i> polyporopepsin.
39	NLTIGTGTGT--TLNLDFTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Schizosaccharomyces pombe</i> asp. endopept.
40	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Neurospora crassa</i> neurosporopepsin.
41	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Hordeum vulgare</i> phytpepsin.
42	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Cynara cardunculus</i> cyprosin.
43	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Vigna unguiculata</i> phytpepsin.
44	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Plasmodium falciparum</i> plasmepepsin 1.
45	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>P. falciparum</i> plasmepepsin 2.
46	ELIGITPQODEFTVVFDTGSSNLWVPSVYCS	PHIQVGSGLTG	CEAIVDTGTSLLTGP				<i>Eimeria acervulina</i> aspartic endopeptidase.

**Obr. 1.4. Srovnání primární struktury okolí aktivního centra vybraných aspartátových peptidas z rodiny A1.** Katalytické aspartáty jsou znázorněny červeně, Tyr75 je označen modře (číslováno dle pepsinu). Shodné sekvence aminokyselin jsou podbarveny černě.

Převzato a upraveno z<sup>2</sup>

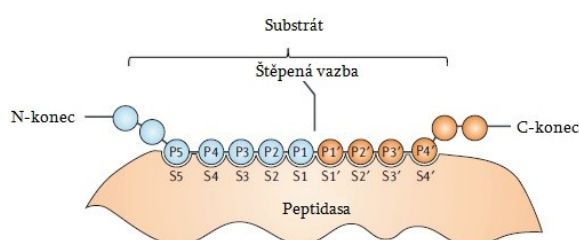
Prostorové struktury některých aspartátových peptidas byly vyřešeny pomocí rentgenostrukturní analýzy např. u pepsinu A<sup>15</sup> (obr. 1.3., str. 16), katepsinu D<sup>16</sup> (obr. 1.9., str. 25), reninu<sup>17,18</sup> či aspartátové peptidasy viru HIV-1<sup>19</sup>.

### 1.2.2. Substrátová specifita aspartátových peptidas

Aktivní centrum aspartátových peptidas z rodiny A1 je tvořeno podélnou dutinou, a proto je schopné interagovat s aminokyselinovými zbytky na obou stranách hydrolyzované vazby. Díky tomu lze štěpený substrát natáhnout do podoby β-skládaného listu a umožnit tak lepší přístup katalytickým zbytkům ke štěpené

peptidové vazbě v endopeptidasovém módu. Afinita enzymu k substrátu je dána interakčními schopnostmi mezi jednotlivými aminokyselinami substrátu s aminokyselinami v aktivním místě a jeho blízkém okolí. Při vhodné kombinaci aminokyselinového složení a délky lze dosáhnout substrátu s vysokými hodnotami katalytických konstant  $k_{kat}/K_M$ <sup>20</sup>.

Pro přesný popis štěpeného peptidového substrátu se používá model podle Schechtera a Bergera, který jednotlivé aminokyseliny v substrátu označuje od N-konce ke štěpené vazbě jako  $P_n - P_1$  a od štěpené vazby k C-konci jako  $P_1' - P_n'$ . Analogickým způsobem se označují i podmísta v peptidase, která vážou substrát jako  $S_n - S_1$  (od N-konce ke štěpené vazbě) a  $S_1' - S_n'$  (od štěpené vazby k C-konci). Aminokyseliny, mezi kterými dochází k hydrolýze ( $P_1$  a  $P_1'$ ), se vážou do podmíst  $S_1$  a  $S_1'$  (obr. 1.5.)<sup>3</sup>.



**Obr. 1.5. Schématické zobrazení vazby substrátu do aktivního centra peptidasy podle Schechtera**

**a Bergera.** Aktivní centrum obsahuje vazebná podmísta  $S$ , která interagují s aminokyselinovými zbytky peptidového substrátu, které se označují  $P$ . Převzato a upraveno z<sup>3</sup>

Většina aspartátových peptidas z rodiny A1 štěpí substráty, které v aminokyselinové sekvenci obsahují velké hydrofobní aminokyseliny. Analýzou štěpů proteinů hydrolyzovaných pepsinem byly zjištěny aminokyselinové zbytky nejlépe interagující s aktivním centrem pepsinu a na základě toho byl vytvořen optimální substrát pro pepsin – heptapeptid Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Val-Leu, který je štěpen ve vazbě Phe-Phe. Sekvence tohoto heptapeptidu byla později optimalizována pro spektrofotometrické analýzy aktivity, kdy Phe v pozici  $P_1'$  byl zaměněn za chromogenní p-nitrofenylalanin a zároveň byla zvýšena rozpustnost tohoto substrátu ve vodném

prostředí. Takto upravený substrát je nyní velmi rozšířeným substrátem pro sledování enzymové aktivity aspartátových peptidas<sup>20</sup>

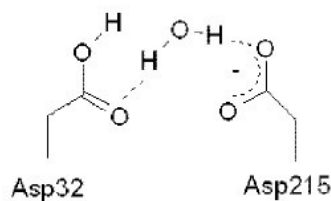
### 1.2.3. Mechanismus katalýzy aspartátových peptidas

Z termodynamického hlediska je peptidová vazba stabilní spojení ( $\Delta G \sim -8,4$  kJ) a pro její rozštěpení je zapotřebí působení 6 M HCl při 100 °C po dobu desítek hodin v bezkyslíkatém prostředí, nebo působení 2-4 M NaOH při 100°C po dobu 4-8 hodin<sup>21</sup>. Je-li hydrolyza peptidové vazby katalyzována enzymaticky, probíhá za fyziologických podmínek velmi rychle a bez spotřeby ATP.

Mechanismus enzymatické hydrolyzy peptidové vazby probíhá obecně ve třech krocích:

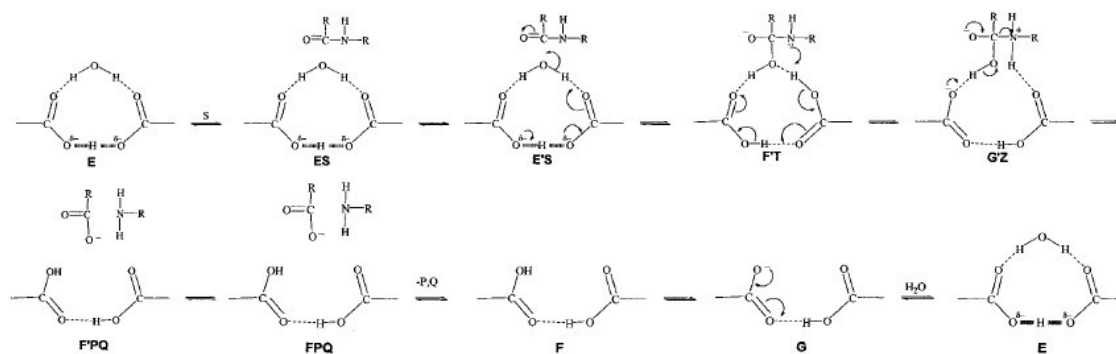
1. nukleofilní atak na karbonyl peptidové vazby, čímž vzniká tetrahedrál ní komplex
2. elektrofilní stabilizace záporného náboje na kyslíkovém atomu karbonylu v tetrahedrál ní komplexu
3. vznik amidu na štěpené vazbě donací protonu a uvolnění výsledného produktu

Mechanismus katalýzy aspartátových peptidas bývá nejčastěji popisován na pepsinu jako modelovém enzymu. Při fyziologickém pH optimu pepsinu (v kyselé oblasti) je jeden z aspartátových zbytků v aktivním centru částečně ionizovaný ( $pK \sim 1,1$ ) a druhý je protonizovaný ( $pK \sim 4,7$ ). Oba aspartáty v aktivním centru vážou vodíkovými můstky molekulu vody, která nukleofilně atakuje hydrolyzovanou peptidovou vazbu (obr. 1.6., str. 21). Toto uspořádání bylo potvrzeno vyřešenými rentgenovými strukturami<sup>21</sup>.



**Obr. 1.6. Schématické znázornění aktivního místa aspartátových peptidas.** Aspartátové zbytky v aktivním centru vážou molekulu vody vodíkovými můstky. Převzato a upraveno z <sup>22</sup>.

Vazbou substrátu do aktivního centra dochází ke správné orientaci substrátu vůči katalytickým zbytkům a ke správnému průběhu katalýzy. Zjednodušeně lze katalytický mechanismus popsat v následujících krocích. (1) Vodík z molekuly vody se přesouvá ke karbonylu aspartátu v pozici 32, čímž na molekule vody vzniká záporně nabitý kyslík, který nukleofilně atakuje štěpenou peptidovou vazbu (karbonyl). (2) Dusík peptidové vazby substrátu přijímá od molekuly vody druhý vodík a tím dochází k úplnému rozpadu peptidové vazby a vzniku produktů. (3) Celý enzym je následně regenerován vazbou nové molekuly vody na záporně nabitě aspartáty (obr. 1.7.) <sup>23</sup>.

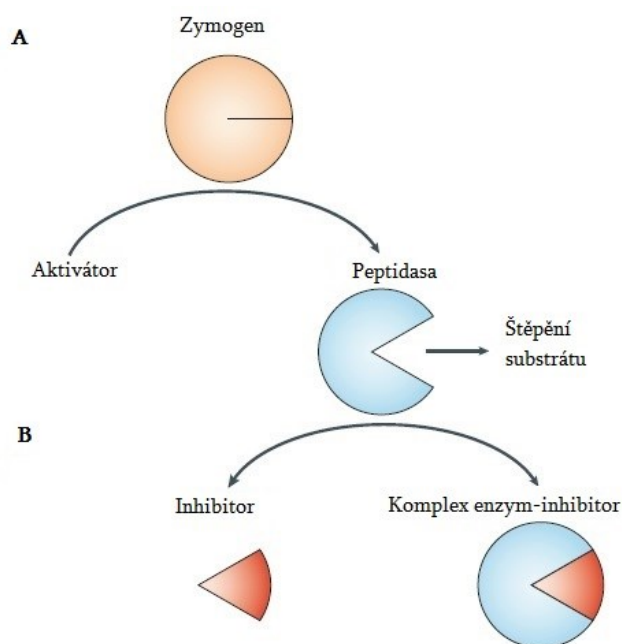


**Obr. 1.7. Průběh katalýzy u aspartátových peptidas.** Na obrázku je zobrazen nukleofilní atak molekuly vody na štěpenou peptidovou vazbu, štěpení této vazby, uvolnění produktů a regenerace enzymů vazbou nové molekuly vody. Podrobnosti jsou uvedeny v textu. Šipkami jsou znázorněny přesuny jednotlivých elektronů a protonů při průběhu katalýzy. Převzato a upraveno z <sup>23</sup>

### 1.2.4. Regulace aktivity aspartátových peptidas

Regulace aktivity peptidas je nezbytná pro jejich správnou funkci v organismu, a proto probíhá na více úrovních (obr. 1.8., str. 23). Prvotní regulace se odehrává již na úrovni genové exprese a následné translace mRNA do proteinové sekvence. Peptidasy jsou produkovány v neaktivní formě proenzymu (zymogenu), který je vlivem změny podmínek (např. snížením pH pod hodnotu 5 v případě aktivace pepsinogenu na pepsin) převeden na funkční formu enzymu. Tomuto procesu se říká autoaktivace. Zymogen může být dále aktivován působením jiné peptidasy, jako tomu je např. u trypsinogenu, který je aktivován pomocí enterokinasy (obr. 1.8. A, str. 23). Na principu aktivace zymogenů fungují celé aktivační kaskády (např. koagulační kaskáda), jedná se pak o víceúrovňovou regulaci biochemických procesů. Dalším příkladem regulace peptidas je aktivace pomocí proteinového komplexu, který se vytvoří na membráně. Tak je tomu např. u prvního kroku aktivace kaspasové kaskády vedoucí k apoptose, která je proteolyticky aktivována komplexem DISC (death-inducing signalling complex)<sup>3</sup>.

Jinou formou regulace peptidasové aktivity je působení kofaktorů, které se reverzibilně vážou na molekulu enzymu a tak brání její aktivitě, nebo modulátorů, které se na peptidasu vážou obvykle allostericky. Významnými allosterickými regulátory a fyziologickými inhibitory peptidas jsou glykosaminglykany. Jedním z nejvíce prozkoumaným glykosaminglykanem je i heparin, který funguje jako allosterický inhibitor faktoru X kaskády srážení krve<sup>3</sup>.



**Obr. 1.8. Regulace aktivity peptidas na více úrovních.** (A) Peptidasa je biosyntetizována ve formě neaktivního zymogenu, který je v případě potřeby aktivován jinou peptidasou (aktivátor); (B) Regulace působením specifického inhibitoru, který se váže do aktivního centra peptidasy a vytváří tak neaktivní komplex peptidasa-inhibitor. Převzato a upraveno z<sup>3</sup>.

V současné době je známo přibližně 100 lidských proteinových inhibitorů peptidas (obr. 1.8. B) popsáných v MEROPS databázi, což je mnohem méně než počet peptidas (přibližně 600). Tuto skutečnost lze vysvětlit nízkou specifitou některých peptidasových inhibitorů, kdy jeden inhibitor může inhibovat více peptidas. Příkladem mohou být inhibitory metalopeptidas, kde byly doposud popsány pouze čtyři lidské inhibitory – TIMP 1 až 4 („tissue inhibitor of metalloproteinase“), které jsou schopny inhibovat všechny zástupce metalopeptidas (více než 180)<sup>3</sup>. Podle inhibičního mechanismu lze proteinové inhibitory peptidas klasifikovat jako reverzibilní (tvoří s peptidasou nekovalentní protein-proteinové komplexy) nebo ireverzibilní (po vazbě na peptidasu vytváří kovalentní komplex)<sup>3,24,25</sup>.

Zvláštní skupinou regulátorů peptidasové aktivity jsou tzv. propeptidy, což jsou peptidy hydrolyticky odštěpené ze sekvence proenzymu při jeho aktivaci. Propeptid má v proenzymu funkci intramolekulárního inhibitoru, který blokuje aktivní centrum a

zabraňuje tak vazbě substrátu. Pro zvýšení stability vůči hydrolýze je zde často vázán v opačné orientaci než substrát<sup>26</sup>. Řada studií ukazuje, že synteticky nebo rekombinantně připravené propeptidy jsou schopny působit jako intramolekulární inhibitory a silně inhibovat své zdrojové peptidasy, jak bylo pozorováno např. u cysteinové peptidasy katepsinu B nebo aspartátové peptidasy katepsinu D<sup>27,28</sup>.

### 1.2.5. Katepsin D

Katepsin D (EC 3.4.23.5) je intracelulární aspartátová endopeptidasa, která je aktivní v kyselém prostředí lysosomu. Řadí se do pepsinové rodiny A1 klanu AA. Hlavní funkcí katepsinu D v lysosomech je primární fragmentace buněčných proteinů, které jsou dále degradovány dalšími lysosomálními endopeptidasami a exopeptidasami. Lze jej izolovat téměř ze všech buněk, tkání a orgánů, výjimku tvoří zralé erythrocyty, které neobsahují lysosomy<sup>29</sup>.

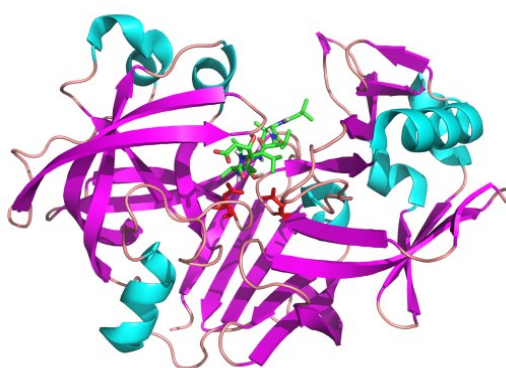
#### 1.2.5.1. Biosyntéza katepsinu D

Lidský katepsin D je biosyntetizován na membráně drsného endoplasmatického retikula ve formě preproproteinu se signální sekvencí (20 aminokyselinových zbytků), která je následně odštěpena signální peptidasou za vzniku prokatepsinu D (52 kDa). Při sbalování prokatepsinu D dochází k tvorbě čtyř disulfidických můstků a molekula je dále N-glykosylována v pozicích Asn70 a Asn199. Samotná glykosylace není nezbytná pro aktivitu ani správné sbalení katepsinu D, podílí se ale na transportu prokatepsinu D do primárního lysosomu<sup>13,29,30</sup>. Manosové zbytky jsou fosforylovány za vzniku manosa-6-fosfátu, který je rozpoznáván specifickým receptorem umožňujícím transport z endoplasmatického retikula do lysosomů<sup>31</sup>. V kyselém prostředí lysosomů se prokatepsin D uvolňuje z receptoru, dochází k defosforylaci manosových zbytků a následně je prokatepsin D aktivován cysteinovými katepsiny, které odštěpí propeptid (44 aminokyselin). Takto vzniklá aktivní jednořetězcová forma katepsinu D (48 kDa) je dále proteolyticky upravována cysteinovými katepsiny za vzniku dvouřetězcové molekuly katepsinu D složené z N-terminálního lehkého řetězce (14 kDa) a C-terminálního těžkého řetězce (34 kDa)<sup>29,32,33</sup>.



### 1.2.5.2. Struktura a substrátová specifita katepsinu D

Katepsin D vykazuje přibližně 45 % sekvenční homologii s pepsinem, chymosinem či reninem a i prostorovou strukturou je velmi podobný jiným aspartátovým peptidasám (obr. 1.9.). V blízkosti S<sub>3</sub>' podmísta má katepsin D, stejně jako renin, polyprolinovou smyčku, která obsahuje tři po sobě jdoucí prolinové zbytky. Podmísto S<sub>2</sub> u katepsinu D je z části tvořeno methioninem (Met307), což je jedinečný znak katepsinu D, jelikož ostatní aspartátové peptidasy mají v dané pozici polární nebo nabitě aminokyseliny.



**Obr. 1.9. Prostorová struktura katepsinu D v komplexu s inhibitorem pepstatinem.** Aspartátové zbytky v aktivním místě jsou označeny červeně, pepstatin je zelený. PDB: 1LYB, upraveno v programu PyMol.

Katepsin D je endopeptidasa, která štěpí substrát uvnitř peptidového řetězce dlouhého alespoň 5 aminokyselinových zbytků. Obvykle štěpí vazby mezi hydrofobními nebo aromatickými aminokyselinami. Například v sekvenci Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys je schopen štěpit dvě peptidové vazby: Phe-Phe a Phe-Tyr<sup>29</sup>. Katepsin D má výraznou aktivitu v rozmezí pH 3,5-5,5 v závislosti na prostředí a typu substrátu.

### 1.2.5.3. Fyziologická funkce katepsinu D

Hlavní rolí katepsinu D v lysosomu je degradace nefunkčních a denaturovaných buněčných proteinů a proteinů endocytovaných do buňky. Proteiny jsou katepsinem D

štěpeny na kratší fragmenty, které jsou dále zpracovány dalšími lysosomálními peptidasami, které je štěpí až na dipeptidy a jednotlivé aminokyseliny<sup>29</sup>.

Katepsin D se také podílí na regulaci aktivity dalších buněčných enzymů aktivací jejich proenzymů nebo degradací peptidasových inhibitorů. Zároveň se podílí na selektivním zpracování a uvolnění biologicky aktivních proteinů (zejména hormonů, růstových faktorů a antigenů)<sup>34,35</sup>.

#### **1.2.5.4. Patologie spojené s katepsinem D**

Katepsin D je spojován s několika závažnými patologiemi. Studovaná je především účast na nádorových onemocněních. Katepsin D velmi výrazně ovlivňuje vznik a vývoj nádorů, kde působí jako mitogen či regulátor angiogeneze a apoptosy. Dále je katepsin D využíván jako diagnostický a prognostický marker vzniku a vývoje nádorového onemocnění, kdy vysoké koncentrace katepsinu D v nádorové tkáni indikují agresivnější typ nádoru<sup>36</sup>. Proto je považován za potenciální cílovou molekulu terapeutického zásahu pro protinádorová chemoterapeutika<sup>37,38</sup>.

Katepsin D je nejvíce studován u nádorového onemocnění prsu (téměř čtvrtina všech nádorových změn u žen)<sup>39</sup>. V prsním nádoru se vyskytuje katepsin D ve třech formách – zralý katepsin D, aktivační intermediát a prokatepsin D. Přesné působení jednotlivých forem katepsinu D není dosud plně prozkoumáno. Předpokládá se kombinované působení jako proteolytický aktivního enzymu a jako mitogenního zymogenu. Jeden z modelů mitogenetického působení předpokládá, že prokatepsin D, který je v nádorových buňkách prsního karcinomu produkován ve výrazném nadbytku často po stimulaci estrogy, uniká klasické proteolytické aktivaci a je rozpoznáván receptorovým systémem pro mitogenní aktivaci<sup>40</sup>.

Prokatepsin D byl také detekován v mateřském mléce, zatím však není známo, zda má nějakou významnou fyziologickou úlohu. Nicméně, u dospělých žen, které byly v dětství kojeny, bylo popsáno nižší riziko vzniku nádoru prsu, proto se spekuluje, že by mohl fungovat jako určitá forma prevence vůči pozdějšímu nádoru prsu či vaječníků<sup>40,41</sup>.

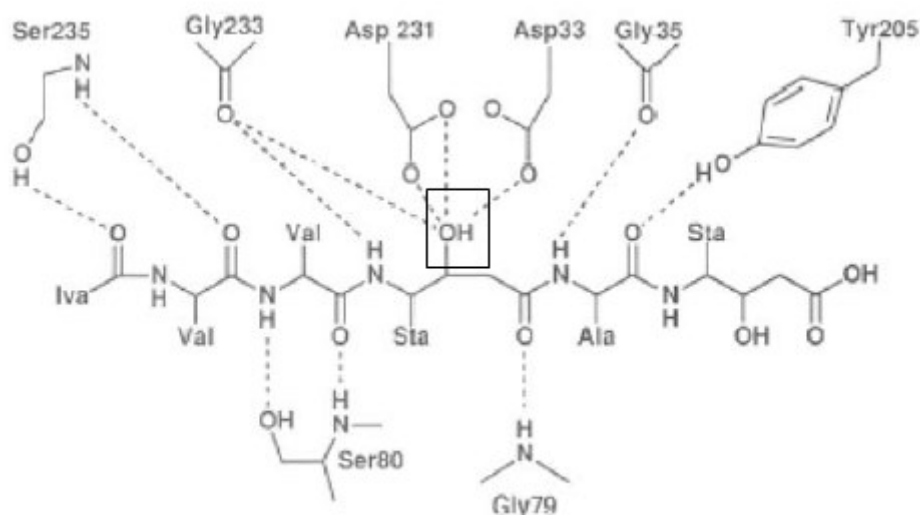
Katepsin D je rovněž často spojován s Alzheimerovou chorobou, protože se účastní úprav proteinů souvisejících s její patogenezí (např. amyloidního prekursorového proteinu). Katepsin D souvisí také s aterosklerózou především proto, že se účastní modifikace LDL částic, které jsou poté dostupnější pro makrofágy a snadněji z nich vznikají pěnové buňky blokuující cévy<sup>42</sup>.

### 1.3. Proteinové inhibitory peptidas

Proteinové inhibitory patří mezi významné regulátory aktivity proteolytických enzymů a byly objeveny u všech živých organismů. Podle sekvenční homologie se klasifikují do 67 rodin, které je možné nalézt v databázi MEROPS<sup>4</sup>. Rodiny inhibitoru se dále spojují do vyšších klanů na základě evoluční příbuznosti a podobnosti terciární struktury. Během evoluce inhibitorů došlo ke značné specializaci a jednotlivé rodiny inhibitorů regulují většinou pouze jednu třídu peptidas. Existují však rodiny inhibitorů, které jsou schopny regulovat aktivitu až tří skupin peptidas. Příkladem jsou rostlinné inhibitory z Kunitzovy rodiny, které jsou schopné inhibovat aspartátové, serinové i cysteinové peptidasy<sup>43</sup>.

#### 1.3.1. Inhibitory aspartátových peptidas

Univerzálním inhibitorem aspartátových peptidas je pepstatin, hexapeptid, který ve své sekvenci obsahuje nestandardní aminokyseliny isovalin (Iva) a statin (Sta)<sup>44</sup>. Pro mechanismus působení pepstatinu je klíčový statinový zbytek Sta4, jehož hydroxyl vytěsňuje z aktivního centra enzymu molekulu vody, která je nezbytná pro hydrolyzu (obr. 1.10., str. 28). Pepstatin je silný reverzibilní inhibitor, působí již při pikomolárních koncentracích a lze ho využít jako ligand při afinitních chromatografiích<sup>45</sup> nebo k titracím enzymů<sup>46</sup>.

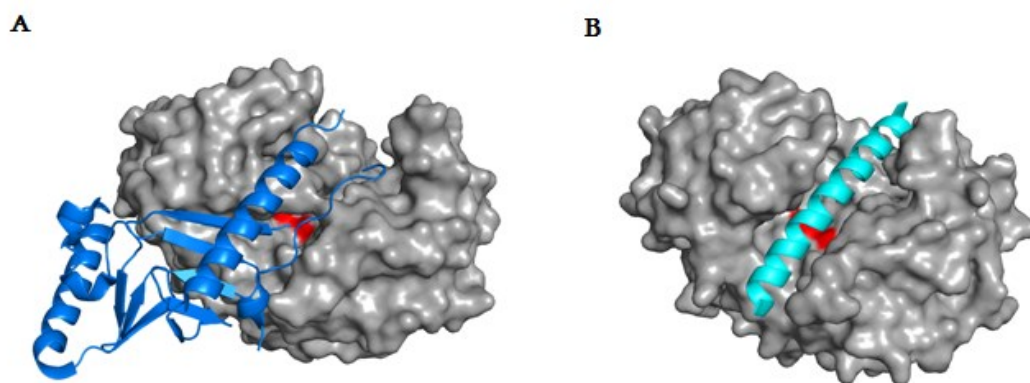


**Obr. 1.10.** Vazba pepstatinu do aktivního místa katepsinu D. Přerušovanými čarami jsou zobrazeny vodíkové vazby mezi pepstatinem a aminokyselinami v aktivním centru katepsinu D (horní část obrázku). V dolní části jsou znázorněny aminokyseliny Ser80 a Gly79 ze smyčky enzymu, které se také podílejí na vazbě inhibitoru. V rámečku je hydroxylová skupina statinu (Sta4), která interaguje s katalytickými aspartáty (Asp33 a Asp231) a nahrazuje molekulu vody v aktivním centru enzymu. Převzato a upraveno z <sup>47</sup>.

Synteticky připravené inhibitory aspartátových peptidas jsou obvykle analoga substrátů těchto enzymů. Štěpená peptidová vazba je v nich však nahrazena nekódovanými aminokyselinami vázajícími se do katalytického centra (např. statinem<sup>46</sup>) nebo nehydrolyzovatelnými vazbami, jako je např. redukováná amidová vazba ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ) nebo hydroxylenová vazba ( $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ ). Jinou modifikací při přípravě syntetického inhibitoru je záměna L-formy za D-formu aminokyseliny. Tímto způsobem byl připraven např. heptapeptid pGlu-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-D-Trp, ve kterém D-Trp zajišťuje silnější vazbu inhibitoru na enzym, zatímco D-Phe se podílí na stabilizaci inhibitoru proti proteolytické degradaci jinými peptidasami<sup>48</sup>.

Pepstatin a inhibitor ATBI jsou přirozené inhibitory aspartátových peptidas, které mají oligopeptidový charakter a jsou produkovány bakteriemi. Kromě nich bylo popsáno i pět přirozených inhibitorů aspartátových peptidas, které jsou polypeptidového nebo

proteinového charakteru a patří do odlišných rodin inhibitorů, produkovaných v kvasinkách, bezobratlých živočiších a rostlinách (tab. 1.2.). Pro pepstatin (obr. 1.3., str. 16), kvasinkový inhibitor IA-3 (obr. 1.11. B) a inhibitor PI-3 z hlístice (obr. 1.11. A) byly vyřešeny prostorové struktury v komplexu s příslušnou aspartátovou peptidasou<sup>49–51</sup>.



**Obr. 1.11. Struktury aspartátových peptidas v komplexu s přirozenými inhibitory.**  
 (A) Prostorová struktura pepsinu v komplexu s inhibitorem PI-3 (PDB: 1F34).  
 (B) Prostorová struktura proteinasy A v komplexu s inhibitorem IA-3 (PDB: 1DPJ). Peptidasy jsou znázorněny šedě povrchovým modelem se zvýrazněným katalytickým místem (červeně). Inhibitor je znázorněn stužkovým modelem modře a tyrkysově. Upraveno v programu PyMol.

**Tab. 1.2 Příklady přirozených inhibitorů aspartátových peptidas.**

Název	Původ	Struktura	Inhibované peptidasy
pepstatin <sup>44</sup>	bakterie rodu <i>Actinomyces</i>	Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta	aspartátové peptidasy
ATBI <sup>52</sup>	bakterie rodu <i>Bacillus</i>	Ala-Gly-Leu-Leu-Asp-Asp-Asp-Pro-Pro-Glu	F-proteasa, pepsin
IA-3 <sup>50</sup>	kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	polypeptid (7 kDa)	proteinasa A
SQAPI <sup>53</sup>	dýně <i>Cucurbita maxima</i>	polypeptid (10,5 kDa)	pepsin
PI-3 <sup>51</sup>	hlístice <i>Ascaris suum</i>	protein (19 kDa)	pepsin
PDI <sup>54</sup>	lilek brambor ( <i>Solanum tuberosum</i> )	glykoprotein (22 kDa)	katepsin D
equistatin <sup>55</sup>	sasanka koňská ( <i>Actinia equina</i> )	protein (22 kDa)	katepsin D

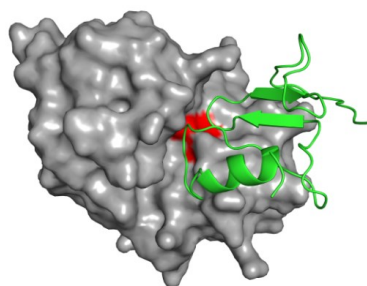
### 1.3.2. Thyropiny

Thyropiny („thyroglobulin type-1 domain proteinase inhibitors“)<sup>56</sup> tvoří rodinu proteinových inhibitorů I31, která nebyla doposud plně prozkoumána. Tyto inhibitory jsou cíleny proti peptidasám ze třídy cysteinových a aspartátových peptidas. Dělí se podle počtu cysteinových zbytků na thyropiny 1A se šesti a thyropiny 1B se čtyřmi cysteinovými zbytky<sup>57</sup>. Společnou vlastností thyropinů je přítomnost domény, která je sekvenčně homologní s thyreoglobulinovou doménou typu 1.

Thyropiny a jejich homologické proteiny bez inhibiční aktivity byly objeveny v různých organismech a jejich funkce jsou velmi rozmanité. Řadí se sem např. nidogen, který je součástí membrány, kde interaguje s lamininem a kolagenem IV, dále markerové proteiny nádoru slinivky (GA733) či IGFBP (insulin-like growth factor binding protein)<sup>56</sup>. Jedním z nejvíce prostudovaných thyropinů je p41 isoforma invariantního řetězce, který asociuje s MHC proteiny II. třídy a brání tak předčasné vazbě antigenu na MHC proteiny II. třídy<sup>58,59</sup>, zároveň je ale také schopný silně inhibovat lysosomální cysteinové peptidasy (obr. 1.12., str. 31), které se účastní úpravy antigenů<sup>56</sup>.

#### 1.3.2.1. Thyreoglobulinová doména typu 1

Thyreoglobulin je glykoprotein produkovaný výhradně štítnou žlázou, který se účastní syntézy thyroidálních hormonů thyroxinu a trijodthyroninu<sup>56</sup>. Thyreoglobulinová doména typu 1 je tvořena přibližně 50 aminokyselinovými zbytky, mezi kterými mají významné zastoupení zbytky cysteinu, prolinu a glycinu a pozice těchto aminokyselin jsou konzervované. Charakteristickým znakem této domény jsou dva konzervované sekvenční motivy Gln-Cys a Cys-Trp-Cys-Val<sup>57,60</sup>. Fyziologická funkce domény není dosud plně objasněna, nicméně se předpokládá, že se významně podílí na funkci thyreoglobulinu a jeho štěpení při produkci thyroidálních hormonů v thyrocytech<sup>61</sup>.



**Obr. 1.12. Struktura invariantního řetězce p41 v komplexu s katepsinem L (PDB: 1ICF).** Šedě je zobrazen povrch katepsinu L s vyznačeným katalytickým centrem (červeně), zeleně je zobrazena molekula p41 jako stužkový model. Upraveno v programu PyMol.

### 1.3.2.2. Equistatin

Peptidasový inhibitor equistatin z rodiny thyropinů byl izolován ze sasanky koňské (*Actinia equina*), mořského živočicha, který patří do kmene žahavců, třídy korálnatců (obr. 1.13., str. 32). Equistatin se skládá ze 199 aminokyselin. Molekulová hmotnost equistatinu je 21,8 kDa a jeho izoelektrický bod 4,7<sup>62</sup>. Primární sekvence equistatinu vykazuje 37% sekvenční homologii s thyreoglobulinovou doménou typu 1. Equistatin je složen ze tří sekvenčně homologických domén označovaných Eqd1, Eqd2 a Eqd3<sup>62,63</sup>, přičemž všechny domény obsahují strukturní motiv Cys-Trp-Cys-Val (v případě domény 2 je Trp v pozici 111 zaměněn za Tyr), který je typický pro inhibitory z rodiny thyropinů. Jednotlivé domény se liší svou funkcí. Eqd1 a Eqd2 jsou peptidasové inhibitory, které jsou schopné inhibovat některé zástupce cysteinových (Eqd1) a aspartátových (Eqd2) peptidas. Funkce Eqd3 není doposud známa<sup>63,55</sup>.



**Obr. 1.13. Sasanka koňská (*Actinia equina*). Převzato z <sup>64</sup>**

Prostorová struktura equistatinu jako celku ani jeho jednotlivých domén není dosud popsána. Základní informace o struktuře tohoto proteinu byly získány pomocí spekter cirkulárního dichroismu v oblasti vzdáleného UV záření. Z porovnání spekter jednotlivých domén se spektrem celého equistatinu je patrné, že domény se navzájem konformačně neovlivňují. Domény Eqd1 a Eqd2 ve volném stavu nevykazují výraznou sekundární strukturu. Ze srovnání spekter samotné domény Eqd2, katepsinu D a jejich komplexu vyplývá, že interakce enzym-inhibitor vede ke konformační změně, která nebyla pozorována v případě interakce mezi doménou Eqd1 a cysteinovou peptidasou papainem<sup>65</sup>.

### 1.3.2.3. Equistatin jako peptidasový inhibitor

Bylo zjištěno, že equistatin jako celek i jeho samotná doména Eqd1 působí jako velmi účinný inhibitor některých zástupců cysteinových peptidas klanu CA z rodiny papainu, jako jsou například rostlinný papain, lidský katepsin S nebo cruzipain z parazitického prvoka *Trypanosoma cruzi*<sup>66,67</sup>. Naměřené inhibiční konstanty  $K_i$  pro tyto peptidasy s equistatinem a Eqd1 dosahovaly subnanomolárních hodnot.

Doména Eqd2 a celý equistatin jsou účinné inhibitory aspartátové peptidasy katepsinu D, hodnoty  $K_i$  jsou v subnanomolární oblasti. Je zajímavé, že equistatin je pro katepsin D specifický inhibitor. Dosud nebyla prokázána inhibice jiné aspartátové peptidasy, přičemž byl testován pepsin, chymosin i HIV proteasa. Zároveň bylo zjištěno, že jiný zástupce proteinové rodiny thyroproteinů, isoforma p41 invariantního řetězce, který



sdílí s equistatinem 41% homologii, nemá na aktivitu katepsinu D žádný inhibiční účinek<sup>68</sup>.

#### **1.3.2.4. Equistatin jako proteinový insekticid**

Equistatin byl testován jako potenciální přírodní insekticid proti rostlinným škůdcům, u nichž je trávení proteinů založeno na cysteinových a aspartátových peptidasách. V rámci této studie byl zkoumán vliv různých proteinových inhibitorů cysteinových peptidas na trávicí peptidasy mandelinky bramborové. Listy lilku brambor byly ošetřeny inhibitory a byl pozorován efekt na larvy mandelinky bramborové, které se takto ošetřenými listy živily. Larvy měly výrazně zpomalený růst (po 4 dnech dosáhly pouze 5 % hmotnosti oproti běžné váze) a také relativně vysokou úmrtnost (kolem 35 %). Ještě vyššího efektu na úmrtnost larev mandelinky bramborové (až 47 %) se dosáhlo v případě, že byl equistatin využit v kombinaci s dalšími inhibitory peptidas, které rostliny produkovaly po indukci methyljasmonátem<sup>69</sup>. Equistatin by se tak v budoucnu mohl využívat k ochraně rostlin před herbivorním hmyzem a jinými škůdci rostlin, jejichž trávicí systém je založen na kombinaci aspartátových a cysteinových peptidas, které je equistatin schopen blokovat<sup>70</sup>. Pilotní studie popisují také přípravu transgenních rostlin lilku brambor, které exprimovaly equistatin, nicméně v rostlinném pletivu docházelo k jeho proteolytické degradaci<sup>71</sup>.

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce se zabývá equistatinem ze sasanky koňské (*Actinia equina*). Jedná se o peptidasový inhibitor proteinového charakteru z rodiny thyropinů, jehož funkční a strukturní vlastnosti nebyly doposud podrobně studovány. Proteinová doména Eqd2 equistatinu je jedním z mála známých přirozených inhibitorů aspartátových peptidas a má potenciální využití při regulaci medicíně významných peptidas.

Dílčí cíle diplomové práce jsou následující:

- 1) Produkce Eqd2 rekombinantní expresí v kvasinkách *Pichia pastoris*
- 2) Vývoj a optimalizace protokolu pro chromatografickou purifikaci rekombinantního Eqd2
- 3) Biochemická charakterizace Eqd2, zejména analýza interakce a inhibiční specifity Eqd2 s modelovými aspartátovými peptidasami
- 4) Zahájení krystalizačních experimentů s Eqd2 pro budoucí rentgenostrukturní analýzu

## 3. MATERIÁLY A POUŽITÉ METODY

### 3.1. Materiály

#### 3.1.1. Biologický materiál

*Invitrogen, USA*

Kvasinkové buňky *Pichia pastoris*, kmen X-33 (transformované plasmidem pPICZ $\alpha$  A v laboratoři dr. Michaela Mareše na ÚOCHB AV ČR). Plasmid pPICZ $\alpha$  A byl laskavě poskytnut Maartenem A. Jongsmou (Wageningen University & Research, Nizozemsko).

#### 3.1.2. Chemikálie

##### 3.1.2.1. Enzymy

*AcroBiosystems, USA*

$\beta$ -sekretasa

*Serva, Německo*

chymotrypsin, trypsin

*Sigma, USA*

papain, pepsin, proteinasa A, renin

*ÚOCHB AV ČR (připraveno v laboratoři dr. M. Mareše)*

katepsin D z klíštěte obecného, katepsin D z mandelinky bramborové, lidský

katepsin D, legumain

*ÚOCHB AV ČR (připraveno v laboratoři dr. P. Řezáčové)*

HIV proteasa

### 3.1.2.2. Peptidové substráty

*Bachem, Německo*

Arg-Glu-(EDANS)-Ile-His-Pro-Phe-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Tyr-Lys-

(Dabcyl)-Arg,

Cbz-Ala-Ala-Asn-Amc,

Cbz-Phe-Arg-Amc,

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Amc

*PeptaNova, Německo*

Mca-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys-Dnp-Arg-Arg

*ÚOCHB AV ČR (zakázková syntéza peptidů)*

Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu,

Abz-Tyr-Ile-Nle-Nph-Gln-Arg

### 3.1.2.3. Krystalizační sady

*Jena Bioscience, Německo*

JBScreen JCSG++

*Molecular Dimensions, Velká Británie*

Morpheus® HT, Stura Foot Print Combination HT-96

### 3.1.2.4. Standardy molekulových hmotností pro SDS-PAGE

*BioRad, USA*

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

*Fermentas, Lotyšsko*

PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder,

Spectra Multicolor Ultra Low Range Protein Ladder

### 3.1.2.5. Ostatní chemikálie

*Fluka, Německo*

N,N-methylenbisakrylamid, PEG 1500

*ForMedium, Velká Británie*

YNB médium

*Lach:ner, Česká republika*

methanol, síran amonný, hydroxid sodný, aceton

*Penta, Česká republika*

hydrogenfosforečnan didraselný, dihydrogenfosforečnan draselný, glycerol, kyselina octová, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, ethanol

*Serva, Německo*

peroxodisíran amonný (APS), Coomassie Brilliant Blue R-250

*Sigma, USA*

biotin, Zeocin™, Trizma® báze, dodecylsulfát sodný (SDS), akrylamid, hovězí sérový albumin (BSA), glycin, chlorid vápenatý, 1,4 - dithiotreitol (DTT), uhličitan sodný, dusičnan stříbrný, formaldehyd, glutaraldehyd, octan amonný, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), β-merkapt ethanol, N, N, N', N' - tetraethylenmethyldiamin (TEMED)

### 3.1.3. Přístroje a vybavení

#### 3.1.3.1. Přístroje

Analytické váhy 82/220/2X

*Radwag, Polsko*

Autokláv Labo Auoclave

*Sanyo, Japonsko*

Blotovací zařízení Power Pac HC™

*BioRad, USA*

Centrifuga Allegra® X-15R

*Beckman Coulter, USA*

Centrifuga Eppendorf 5424R

*Eppendorf, Německo*

Centrifuga Sorvall Evolution RC	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	<i>Tecan, Rakousko</i>
FPLC ÄKTA Explorer	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>
Lyofilizátor Freezone 6 liter	<i>Labconco, USA</i>
Orbitální třepačka Innova® 44	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
Orbitální třepačka PSU-20i	<i>Biosan, Lotyšsko</i>
pH metr Orion 3 Star	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
Termoblok QBH2 Grant	<i>P-lab, Česká republika</i>
Vertikální elektroforéza Power Pac Basic	<i>BioRad, USA</i>
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	<i>Thermosavant, USA</i>

### **3.1.3.2. Komerční soupravy**

Pierce® BCA Protein Assay Kit	<i>Thermo Fischer Scientific, USA</i>
-------------------------------	---------------------------------------

### **3.1.3.3. Kolony a nosiče**

Sephadex G-25	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>
MonoS™ 5/50 GL	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>
MonoQ™ 5/50 GL	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>
Hi-Load™ 16/10 Q-Sepharose™ HP	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>
Superdex™ 75 10/300 GL	<i>GE Healthcare Life Sciences, Švédsko</i>

### **3.1.3.4. Ostatní vybavení**

Koncentrátory Amicon	<i>Millipore, USA</i>
PVDF membrána	<i>Millipore, USA</i>
Mikrotitrační destičky	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
Rotilabo®-syringe filtr	<i>Carl Roth, Německo</i>

## 3.2 Metody

### 3.2.1. Rekombinantní exprese v *Pichia pastoris*

Rekombinantní exprese Eqd2 probíhala v methylotrófních kvasinkách *Pichia pastoris* (kmen X-33), které byly připraveny v laboratoři dr. M. Mareše na ÚOCHB AV ČR transformací plasmidem pPICZ $\alpha$  A (viz obr. 3.1., str. 40) s příslušnou nukleotidovou sekvencí pro Eqd2. Plasmid pPICZ $\alpha$  A, který byl poskytnut Maartenem A. Jongsmou (Wageningen University & Research, Nizozemsko), obsahuje faktor  $\alpha$ , který umožňuje sekreci exprimovaného proteinu do kultivačního média, a gen pro rezistenci na Zeocin.

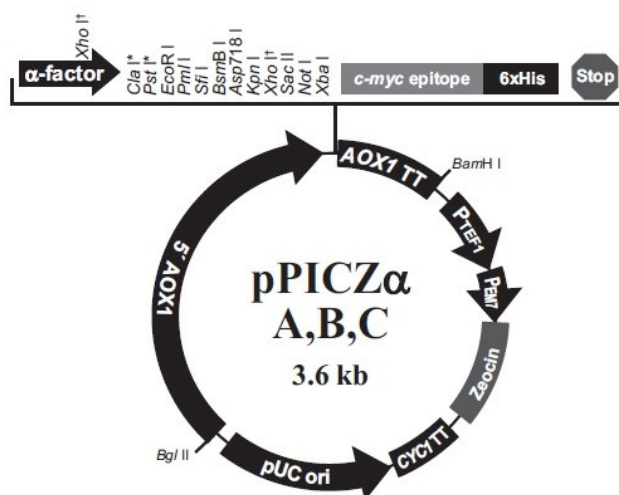
Kvasinky byly kultivovány v 50 ml BMG média se Zeocinem (v koncentraci 25  $\mu$ g/ml) při 30 °C a za třepání (220 RPM) přes noc. Následně byly buňky převedeny do 500 ml BMG média se Zeocinem a kultivovány do OD<sub>600</sub> = 4-5 za stejných podmínek. Poté byly kvasinky převedeny do 500 ml BMM média se Zeocinem, kde byly kultivovány následujících 6 dní. Během této fáze bylo pro indukci exprese Eqd2 každý den do média přidáváno 5 ml methanolu (finální koncentrace 1% methanol v médiu). Pro analýzu produkce rekombinantního Eqd2 byly každý den odebrány 2 ml alikvoty média, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kap. 3.2.5., str. 43). Po 6 dnech byla inkubace ukončena centrifugací kvasinek (5 min při 4 °C a 2000g) a supernatant obsahující Eqd2 byl zamražen v -80°C.

**BMG médium:** 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, 1,34% YNB, 1% glycerol, 4·10<sup>-5</sup>% biotin,

25  $\mu$ g/ml Zeocin<sup>TM</sup>

**BMM médium:** 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, 1,34% YNB, 1% methanol, 4·10<sup>-5</sup>% biotin,

25  $\mu$ g/ml Zeocin<sup>TM</sup>



*Obr. 3.1. Plasmid pPICZα. Převzato a upraveno z<sup>72</sup>*

### 3.2.2. Purifikace Eqd2

Supernatant získaný v kap. 3.2.1., str. 39 byl zkoncentrován lyofilizací z objemu 500 ml na přibližně 50 ml a tento materiál byl dále použit pro chromatografii.

#### 3.2.2.1. Odsolení média pomocí gelové chromatografie

Koncentrovaný supernatant byl dvakrát centrifugován (4000g a 49000g, 10 min při 8 °C), zfiltrován přes 0,45 µm filtr s CME membránou a poté nanesen na kolonu Sephadex G-25. K ekvilibraci kolony a chromatografování byla použita Milli Q voda. Průtok kolonou byl nastaven na 2 ml/min a byly sbírány frakce o objemu 10 ml.

Pro určení frakcí obsahujících proteiny byla v jednotlivých frakcích měřena absorbance při  $\lambda = 280$  nm a konduktivita. Frakce, které obsahovaly proteiny, byly spojeny a skladovány při -20 °C pro další zpracování. Z jednotlivých frakcí byly odebrány 200 µl alikvoty, ze kterých byly proteiny precipitovány acetonem a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Kolona: Sephadex G-25

Eluční roztok: Milli Q voda



### 3.2.2.2. Purifikace Eqd2 na iontoměničových kolonách

V dalším kroku purifikace Eqd2 byla provedena chromatografie na iontoměničových kolonách s využitím FPLC systému. Získané chromatogramy byly upraveny v programu UNICORN. Proteinová frakce připravená v kap. 3.2.2.1. (str. 40) byla před chromatografií zahuštěna pomocí lyofilizace na konečný objem 50 ml.

#### Kolony Mono S a Mono Q

Kolona Mono S (resp. Mono Q) byla ekvilibrována 5 objemy kolony (CV, „column volume“) nanášecího pufru. Následně byl nanesen proteinový vzorek (5 ml, 3 mg/ml), který byl předem zředěn nanášecím pufrem, kolona byla promyta 2 CV nanášecího pufru a po ustálení absorbance při 280 nm byla provedena eluce gradientem NaCl (1 % elučního pufru za 1 CV). Z frakcí, které obsahovaly proteiny (podle absorbance při 280 nm), byly odebrány 200  $\mu$ l alikvoty, které byly po acetonové precipitaci analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce, které obsahovaly Eqd2, byly spojeny a skladovány při -20 °C pro další zpracování.

Kolony: Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL a Mono Q<sup>TM</sup> 5/50 GL

Nanášecí pufr pro Mono S: 50 mM Na-acetát, pH 3,0 - 5,2

Eluční pufr pro Mono S: 50 mM Na-acetát, 0,5 M NaCl, pH 3,0 - 5,2

Nanášecí pufr pro Mono Q: 25mM Tris-HCl, pH 8,5 – 9,5

Eluční pufr pro Mono Q: 25 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5 – 9,5

#### Kolona Q-Sepharose

Kolona Q-Sepharose byla ekvilibrována 1,5 CV nanášecího pufru. Poté byl nanesen proteinový vzorek (25 ml, 3 mg/ml) zředěný nanášecím pufrem, následně byla kolona promyta 2 CV nanášecího pufru a po ustálení absorbance při  $\lambda = 280$  nm byl z kolony vzorek eluován gradientem NaCl (5 % elučního pufru za 1 CV). Z frakcí, které obsahovaly proteiny (dle absorbance při  $\lambda = 280$  nm) byly odebrány 50  $\mu$ l alikvoty, které byly po acetonové precipitaci analyzovány pomocí SDS-PAGE. Zároveň byl ve frakcích monitorován Eqd2 pomocí stanovení inhibice katepsinu D (viz kap. 3.2.8.1., str. 45).

Frakce s Eqd2 byly poté spojeny a koncentrovány na koncentrátoru Amicon (MWCO 3000 Da) na konečnou koncentraci 15 mg/ml.

Kolona: Hi-Load™ 16/10 Q-Sepharose™ HP

Nanášecí pufr: 50 mM Tris-HCl, pH 9,5

Eluční pufr: 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 9,5

### 3.2.2.3. Purifikace Eqd2 pomocí gelové chromatografie

Gelová chromatografie probíhala na koloně Superdex 75, která byla ekvilibrována elučním pufrém. Na kolonu bylo nanášeno 300 µl proteinového vzorku (15 mg/ml) získaného z předchozího kroku purifikace (kap. 3.2.2.2., str. 41). Průtok byl nastaven na 0,8 ml/min a byly sbírány frakce o objemu 0,5 ml. Z frakcí obsahujících proteiny (dle absorbance při  $\lambda = 280$  nm) byly odebrány 20 µl alikvoty a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Ve frakcích byl monitorován Eqd2 pomocí stanovení inhibice katepsinu D (viz kap. 3.2.8.1., str. 45). Frakce, které obsahovaly Eqd2, byly spojeny a koncentrovány na koncentrátoru Amicon (MWCO 3000 Da) na konečnou koncentraci 10 mg/ml.

Kolona: Superdex™ 75 10/300 GL

Eluční pufr: 0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,2

### 3.2.3. Stanovení molekulové hmotnosti pomocí gelové chromatografie

Pro stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 byla sestavena kalibrační křivka pomocí sady proteinů o známé molekulové hmotnosti. Kolona Superdex 75 byla ekvilibrována elučním pufrém, poté byly na kolonu nanášeny jednotlivé kalibrační standardy (BPTI, RNAsa, STI, ovalbumin, BSA, aldolasa, Blue Dextran) o objemu 100 µl (1 mg/ml). Průtok byl nastaven na 0,8 ml/min. Z chromatogramů byly odečteny hodnoty  $V_e$ , ze kterých byla vypočtena hodnota  $K_{AV}$  dle vzorce

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

kde  $V_e$  je eluční objem vzorku,  $V_0$  je mrtvý objem kolony (8,2 ml) a  $V_t$  je celkový objem kolony (18,9 ml). Z vypočítaných hodnot  $K_{AV}$  byl připraven graf závislosti  $K_{AV}$  na  $\log M$  a byla sestavena kalibrační křivka proložení metodou lineární regrese. Za stejných podmínek byl na kolonu nanesen Eqd2 (100  $\mu$ l o koncentraci 1 mg/ml) a na základě elučního objemu byla ze získané kalibrační křivky odečtena jeho molekulová hmotnost.

Kolona: Superdex™ 75 10/300 GL

Eluční pufr: 0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,2

### 3.2.4. Stanovení molekulové hmotnosti hmotnostní spektrometrií

Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 metodou MALDI bylo provedeno v servisní laboratoři dr. J. Cvačky na ÚOCHB AV ČR.

### 3.2.5. Elektroforetické metody

#### 3.2.5.1. Acetonová precipitace proteinů

Vzorky určené pro analýzu pomocí SDS-PAGE byly smíchány s ledovým acetonem na výslednou koncentraci acetonu 80 % a byly inkubovány při -20 °C minimálně 2 hodiny. Poté byly vzorky centrifugovány (21000 g, 10 min při 4 °C), supernatant byl odstraněn a zbylý aceton byl odpařen při 70 °C na vakuové odparce SpeedVac Concentrator.

#### 3.2.5.2. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Roztoky proteinu pro analýzu pomocí SDS-PAGE byly připraveny acetonovou precipitací a poté k nim byl přidán redukční vzorkový pufr (VZP+SH). Takto připravené vzorky byly inkubovány 5 min při 100 °C.

VZP + SH: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 4%  $\beta$ -merkaptoethanol,

0,02% bromfenolová modř, 25% glycerol

### 3.2.5.3. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

SDS-PAGE vycházela z postupu podle Laemmliho<sup>73</sup>. Byl použit 20% separační polyakrylamidový gel a přístroj Power Pac Basic (BioRad). Na gel bylo nanášeno 15 µl vzorku ve vzorkovém pufru (viz kap. 3.2.5.2., str. 43). Po dokončení elektroforézy byl gel 15 min inkubován ve fixačním roztoku (45% ethanol, 10% kyselina octová) a barven stříbrem<sup>74</sup> nebo Coomassie Brilliant Blue R-250. V případě barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 byl gel následně odbarven 10% roztokem kyseliny octové.

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

### 3.2.5.4. Přenos proteinů na PVDF membránu a analýza N-koncové aminokyselinové sekvence

Pro určení N-koncové aminokyselinové sekvence proteinu byly vzorky rozděleny na SDS-PAGE (viz kap. 3.2.5.3.). Poté byl polyakrylamidový gel, PVDF membrána a filtrační papíry ekvilibrovány v transferovém pufru (15 min při 8 °C). Dále byly navrstveny do blotovací aparatury Power Pac HC (BioRad) v pořadí filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír ve směru od katody k anodě. Přenos probíhal po dobu 1 h při konstantním napětí 100 V a chlazení. Po přenosu byla membrána obarvena roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250, odbarvena 50% roztokem methanolu a omyta vodou. Určení N-koncové aminokyselinové sekvence proteinu bylo provedeno pomocí sekvenátoru ABI Procise 491 Ing. Z. Voburkou v servisní laboratoři ÚOCHB AV ČR.

Transferový puf: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycín, 20% methanol, pH 8,3

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

### 3.2.6. Stanovení koncentrace proteinu

Ke stanovení koncentrace proteinu byla použita komerční sada „BCA™ Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific). Pro každé stanovení byla připravena kalibrační

křivka s použitím standardů BSA v rozsahu koncentrací 0-2000 µg/ml. Na mikrotitrační destičku pro UV/VIS měření bylo do jednotlivých jamek pipetováno 25 µl vzorku nebo standardu, ke kterému bylo následně přidáno 200 µl komerčního BCA činidla. Destička se vzorky byla inkubována (30 min při 37 °C) a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm na čtečce GENios M1000 (Tecan). Koncentrace proteinu byla následně odečtena z kalibrační křivky sestavené z BSA standardů.

### **3.2.7. Aminokyselinová analýza**

Aminokyselinová analýza byla provedena na přístroji Biochrom 20 Amino Acid Analyzer R. Součkem v servisní laboratoři ÚOCHB AV ČR.

### **3.2.8. Kinetická měření aktivity enzymu**

#### **3.2.8.1. Analýza inhibice enzymů**

Měření inhibičních konstant pro Eqd2 s peptidasami bylo provedeno v mikrotitračních destičkách v reakčním objemu 100 µl. Složení enzymových směsí, které obsahovaly peptidasu, pufr o koncentraci 100 mM a aditiva je uvedeno v tab. 3.1., str. 46. Všechny vzorky byly zpracovány v triplikátech.

**Tab. 3.1. Měření inhibice peptidas pomocí Eqd2.** V tabulce je definováno složení reakční směsi, ke které byl přidáván Eqd2 v různých koncentracích.

Třída peptidas	Peptidasa	Pufr (pH)	Aditiva	Substrát (koncentrace)
aspartátové	katepsin D	Na-acetát (pH 4,5)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 µM)
	pepsin	Na-acetát (pH 4,0)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 µM)
	proteinasa A	Na-acetát (pH 5,0)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 µM)
	β-sekretasa	Na-acetát (pH 4,5)	0,1 % PEG 1500	Mca-SEVNLDAEFRK-Dnp-RR (250 µM)
	HIV proteasa	Na-acetát (pH 5,0)	0,1 % PEG 1500, 50 mM EDTA	Abz-YInLF*QR (40 µM)
	renin	MES (pH 6,0)	0,1 % PEG 1500, 150 mM NaCl	RE-(EDANS)-IHPFHPFHLVIHYK-(DabcyI)-R (100 µM)
serinové	trypsin	Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 % PEG 1500, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	Cbz-FR-Amc (25 µM)
	chymotrypsin	Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 % PEG 1500, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	Suc-AAPF-Amc (25 µM)
cysteinové	papain	MES (pH 5,5)	0,1 % PEG 1500, 2,5 mM DTT	Cbz-FR-Amc (25 µM)
	legumain	MES (pH 5,0)	0,1 % PEG 1500, 2,5 mM DTT	Cbz-AAN-Amc (25 µM)

Enzymová směs s přídavkem Eqd2 (1,5 µM až 150 µM) byla 10 min preinkubována při 25 °C, reakce byla odstartována přídavkem substrátu a kontinuálně měřena pomocí čtečky GENios M1000 při teplotě 37 °C. FRET substráty (obsahující skupiny Abz a F\*) byly měřeny při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm. Fluorescenční substráty s Amc skupinou byly měřeny při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. Fluorescenční substrát Mca byl měřen při excitační vlnové délce 320 nm a emisní vlnové délce 405 nm. Fluorescenční substrát s EDANS a DabcyI párem byl měřen při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 490 nm. Změřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu Magellan.

Zbytková aktivita inhibované peptidasy byla vypočítána z počátečních rychlostí pomocí vzorce

$$\text{Zbytková aktivita enzymu (\%)} = \frac{v_i}{v_0} * 100,$$

kde  $v_i$  značí počáteční rychlost reakce směsi s inhibitorem a  $v_0$  je počáteční rychlost reakce směsi bez inhibitoru (kontrola). Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafů.

### 3.2.8.2. Určení hodnoty IC<sub>50</sub>

Inhibiční konstanta IC<sub>50</sub> byla určena ze zbytkových aktivit peptidasy pro různé koncentrace inhibitoru Eqd2 (20 pM až 20 μM). Postup měření zbytkové aktivity je popsán v kap. 3.2.8.1., str. 45. Hodnota IC<sub>50</sub> byla odečtena ze sestavené křivky závislosti zbytkové aktivity peptidasy na koncentraci inhibitoru pomocí programu GraFit 5.0.4. Přesná koncentrace Eqd2 v zásobním roztoku byla stanovena metodou aminokyselinové analýzy.

### 3.2.9. Příprava komplexu Eqd2 s peptidasou

1 mg rekombinantního katepsinu D (IrCD) připraveného v laboratoři dr. M. Mareše na ÚOCHB AV ČR byl smíchán s 1,5 mg Eqd2 v pufru 100 mM Na-acetát (pH 4,0) v konečném objemu 400 μl. Směs byla inkubována 30 min při 25 °C a poté byla nanesena na kolonu Superdex 75 ekvilibrovanou elučním pufrem. Při průtoku 0,5 ml/min byly sbírány frakce o objemu 0,5 ml. Z frakcí obsahujících proteiny (dle absorbance při  $\lambda = 280$  nm) byly odebrány 10 μl alikvoty a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce, které obsahovaly komplex IrCD-Eqd2, byly spojeny a koncentrovány na koncentrátoru Millipore (MWCO 10 000 Da) na koncentraci 5 mg/ml.

Kolona: Superdex™ 75

Eluční pufr: 100 mM Na-acetát, 0,2 M NaCl, pH 4,0

### 3.2.10. Krystalizace Eqd2

Eqd2 získaný v kap. 3.2.2.3. (str. 42) byl koncentrován na 10 mg/ml na koncentrátoru Amicon (MWCO 3000 Da), přičemž bylo upraveno složení pufru na

5 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,2. S tímto materiálem byly pomocí robotického přístroje Oryx8 (Douglas Instruments) nasazeny tři sady komerčních krystalizačních roztoků - JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience), Morpheus HT (Molecular Dimensions) a Stura Foot Print Combination HT-96 (Molecular Dimensions). Byla použita metoda sedících kapek o výsledném objemu 0,4  $\mu$ l a poměru mezi zásobním roztokem Eqd2 a krystalizačním roztokem 1:1. Kapky byly automaticky monitorovány pomocí přístroje CrystalMation Gallery DT (Rigaku) po dobu čtyř týdnů a vyhodnoceny v programu CrystalTrack Web.



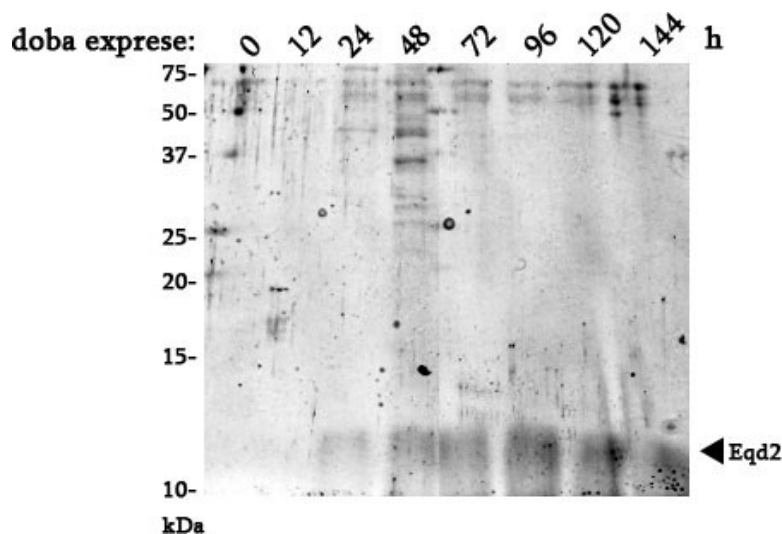
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Rekombinantní exprese Eqd2 v *Pichia pastoris*

Rekombinantní Eqd2 byl exprimován v methylotrófních kvasinkách *Pichia pastoris* kmene X-33 dle postupu uvedeného v kap. 3.2.1. (str. 39). BMG médium se Zeocinem bylo zaočkováno transformovanými buňkami a kultivováno do OD = 4-5. Poté byly buňky převedeny do BMM média se Zeocinem a exprese Eqd2 byla indukována každý den přidavkem methanolu, který *P. pastoris* metabolizují jako jediný zdroj uhlíku. Po šesti dnech od začátku exprese byly buňky sklizeny centrifugací. Díky přítomnosti  $\alpha$ -faktoru v sekvenci plasmidu pPICZ $\alpha$  A (obr. 4.1.) byl exprimovaný Eqd2 účinně sekretován do média. Pro analýzu průběhu exprese byly každý den odebírány alikvoty média, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 4.2., str. 50).

```
ttcattttacgacacttgagagatcaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatcttcot
S F Y D T - E I K N N - L F E T M R F P
tcaatttttactgctgtttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacact
S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T
acaacagaagatgaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagattta
T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L
gaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttattg
E G D F D V A V L P F S N S T N N G L L
tttataaataactactattgccagcattgtctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaa
F I N T T I A S I A A K E E G V S L E K
agagaggctgaagctgctgccttaacacttttgccagatgatgaagcccatcattgtgaat
R E A E A A A T L C Q M M Q A I I V N
gtccctgtgtgtgttgacccatcatgtaagctgacggcagttttgacgaggttcag
V P G W C G P P S C K A D G S F D E V Q
tgctgcgcaagtaattggagaatgctactgtgtgataagaaaggaaagaaacttgaggc
C C A S N G E C Y C V D K K G K E L E G
acaagacaacagggaagccaacctgcgaaagacacctataagcgccgagctttcta
T R Q Q G R P T C E R H L - A A A S F L
gaacaaaaactcatctcagaagaggtctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcat
E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H
cattgagttttagtccttagacatgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaa
H - V C S L R H D C S S V Q V G H L R E
gaccggtccttgctagattctaataagaggatgtcagaatgccatttgctgagagatgc
D R S C - I L I K R M S E C H L P E R C
aggcttcatttatgatacttttttttttaacctataaagtatagtgattttctta
R L H L - Y F F I F N L - S I V I F L
```

**Obr. 4.1. Sekvence Eqd2 zaklonovaná do plasmidu pPICZ $\alpha$  A.** Na obrázku je zobrazena nukleotidová sekvence (malá písmena) a její překlad do sekvence aminokyselin (velká písmena). Žlutě je vyznačen začátek proteinové sekvence. Zeleně je vyznačen začátek přirozené sekvence Eqd2 (dle UniProt P81439). Tučně jsou vyznačeny úseky Eqd2, které byly potvrzeny hmotnostní spektrometrií rekombinantního produktu z média. Aminokyselinové extenze, které jsou navíc součástí rekombinantního produktu, jsou podtrženy.

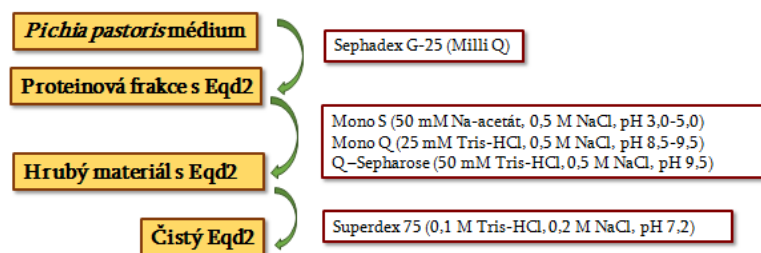


**Obr. 4.2. Časový průběh exprese Ekd2 v *Pichia pastoris* analyzovaný pomocí SDS-PAGE.** Pozice pásu Ekd2 je označena šipkou, pozice standardů molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa. SDS-PAGE gel byl barven Coomassie Brilliant Blue R-250.

Na obr. 4.2. je vidět pás v okolí standardu molekulové hmotnosti 10 kDa, které odpovídá Ekd2. Je zřejmé, že množství Ekd2 sekretovaného do média kontinuálně rostlo s časem a také že Ekd2 je majoritní protein v médiu. Přítomnost Ekd2 v médiu potvrdila také analýza hmotnostní spektrometrií.

## 4.2. Chromatografická purifikace Ekd2

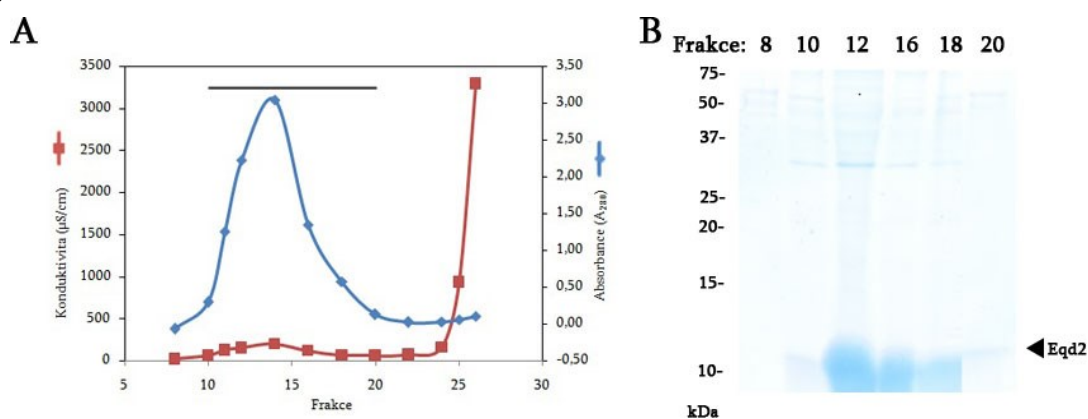
Pro izolaci čistého Ekd2 z expresního BMM média byl navržen purifikační postup, který je znázorněn na obr. 4.3., str. 51. V prvním kroku byla připravena proteinová frakce z expresního média pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G-25. V dalším kroku byla použita iontoměničová chromatografie (testován byl katex a anex) a na závěr byl Ekd2 přečištěn gelovou chromatografií na koloně Superdex 75. K chromatografiím byl použit systém FPLC („fast protein liquid chromatography“).



**Obr. 4.3. Navržené schéma pro purifikaci Eqd2.** Uvedené jsou typy kolon použité v jednotlivých krocích purifikace a složení elučních roztoků.

#### 4.2.1. Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie

Proteinová frakce z expresního BMM média obsahujícího Eqd2 byla připravena pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G-25 (viz kap. 3.2.2.1., str. 40). Na kolonu byl nanášen vzorek expresního média zahuštěného lyofilizací na objem 50 ml; kolona byla ekvilibrována a eluována Milli Q vodou. V jednotlivých frakcích byla změřena absorbance při  $\lambda = 280$  nm a konduktivita (obr. 4.4. A), dále byly frakce obsahující protein analyzovány na SDS-PAGE (obr. 4.4. B). Frakce 10-20, které dle SDS-PAGE obsahovaly Eqd2, byly spojeny a před dalším purifikačním krokem opět zahuštěny lyofilizací.



**Obr. 4.4. Příprava proteinové frakce expresního média.** (A) Gelová chromatografie koncentrovaného média na koloně Sephadex G-25. Ve frakcích byla změřena absorbance při  $\lambda = 280$  nm (modrá) a konduktivita (červená). Frakce označené vodorovnou čarou, které obsahovaly proteiny, byly spojeny. (B) SDS-PAGE analýza proteinů z chromatografických frakcí; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250. Frakce 10–20, které obsahovaly Eqd2, byly spojeny. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa.

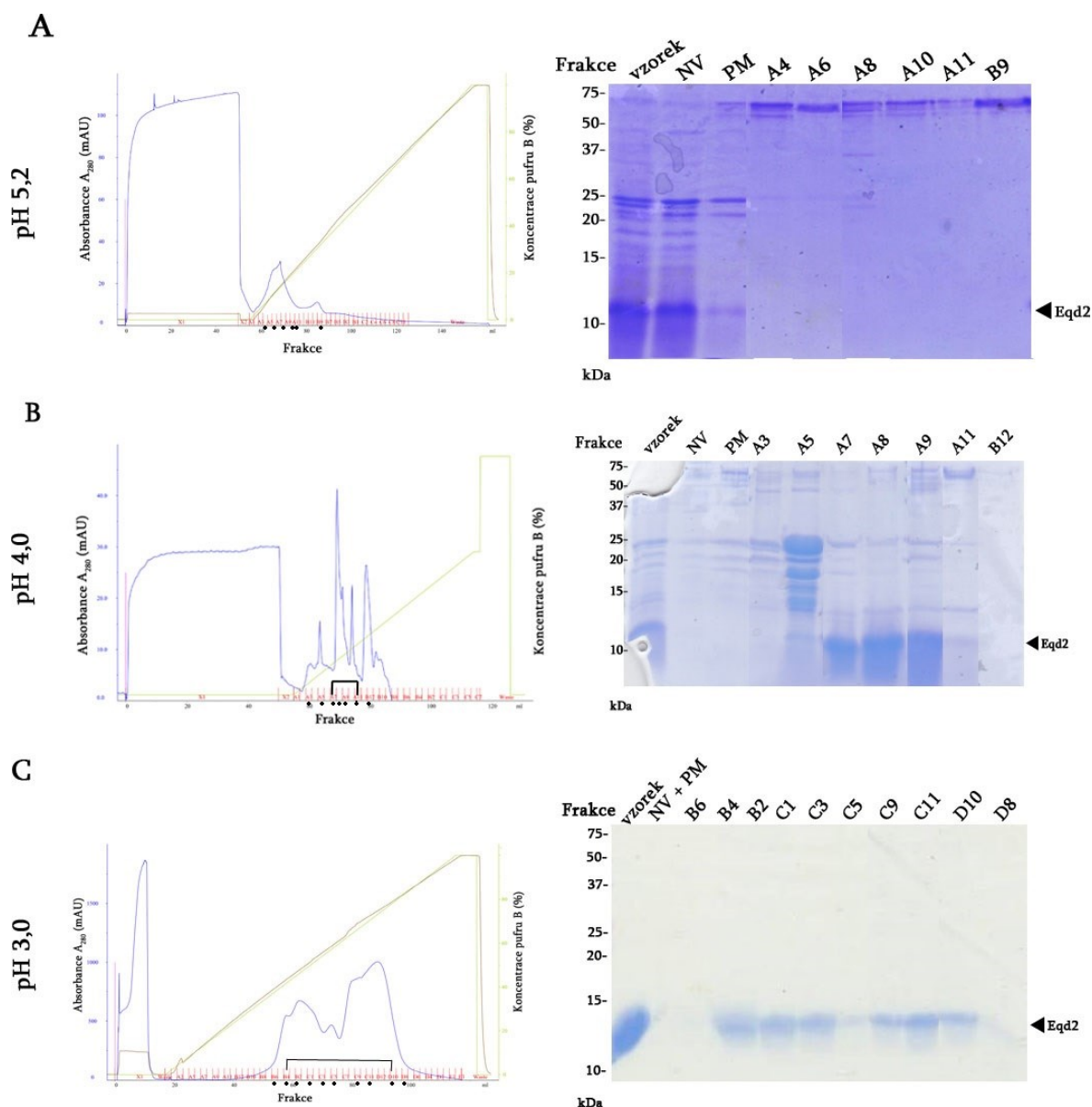
## 4.2.2. Purifikace Eqd2 na iontoměničových kolonách

V dalším kroku byl Eqd2 purifikován na iontoměničových kolonách. Celkem byly testovány tři kolony – Mono S (katex), Mono Q a Q-Sepharose (anexy). Složení a pH pufrů použitých pro jednotlivé kolony bylo navrženo na základě hodnoty pI proteinu Eqd2 ( $pI = 4,94$ ), které bylo určeno z primární sekvence Eqd2 v programu „Compute pI/MW“<sup>75</sup>.

### 4.2.2.1 Purifikace Eqd2 na koloně Mono S

Nejdříve byla testována purifikace Eqd2 pomocí katexové chromatografie na koloně Mono S s využitím pufrů o třech různých hodnotách pH (kap. 3.2.2.2., str. 41). Na kolonu bylo nanášeno 15 mg vzorku, který byl zředěn nanášecím pufrem (50 mM Na-acetát, pH 3,0, 4,0 a 5,2) na výsledný objem 50 ml. Eluce navázaných proteinů probíhala pomocí lineárního gradientu 0 - 0,5 M NaCl a byly sbírány frakce, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Při separaci na koloně Mono S při pH 5,2 nedošlo k navázání Eqd2 na kolonu, jak je vidět na SDS-PAGE analýze jednotlivých frakcí (obr. 4.5. A, str. 53). V dalším kroku bylo sníženo pH chromatografického pufru na hodnotu pH 4,0. Za těchto podmínek došlo k vazbě Eqd2 na nosič, ale oddělení absorpčních vrcholů a kvalita purifikace Eqd2 (ve frakcích A11 – A7) nebyly optimální (obr. 4.5. B, str. 53). Pro lepší separaci Eqd2 od ostatních proteinů bylo v dalším kroku dále sníženo pH pro chromatografii na pH 3,0. Za těchto podmínek došlo k plné vazbě Eqd2 na nosič a jeho eluci v purifikované formě ve dvou absorpčních vrcholech (frakce B6 - D8) (obr. 4.5. C, str. 53).



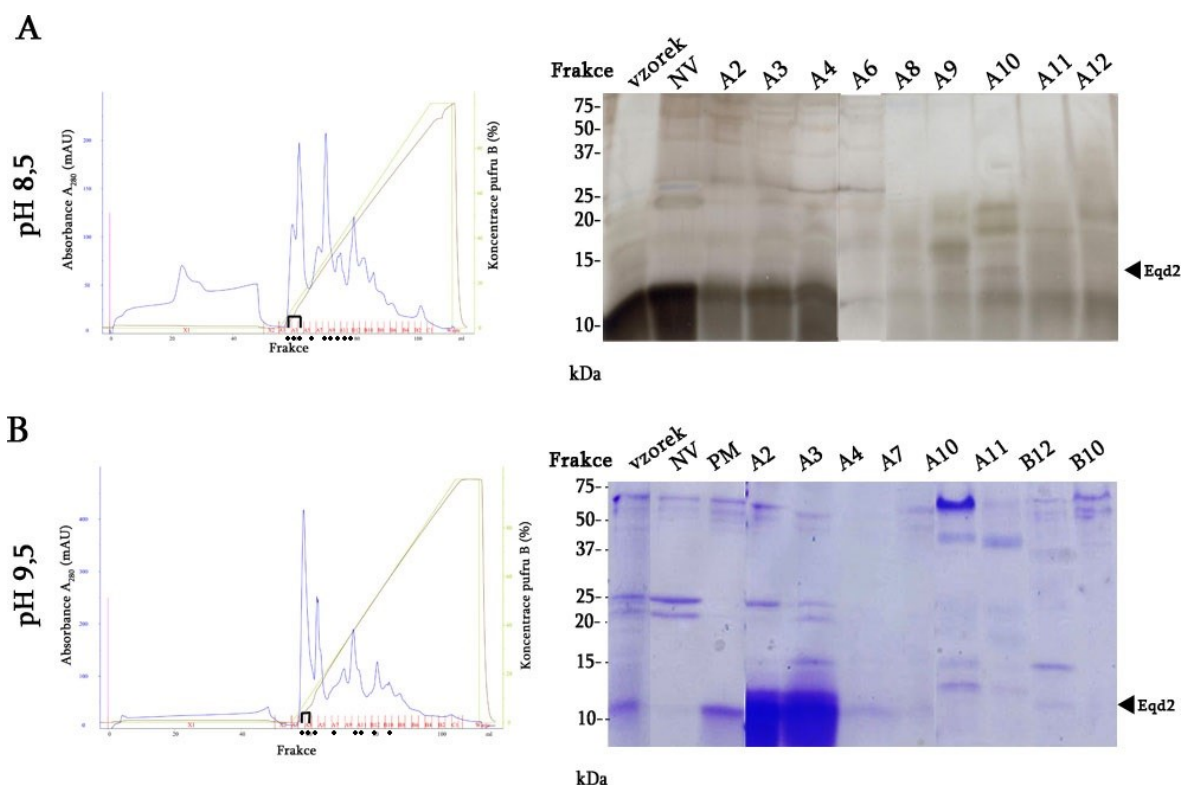
**Obr. 4.5. Separace Eqd2 na koloně Mono S.** Chromatografie byla provedena při pH 5,2 (A), pH 4,0 (B) a pH 3,0 (C). Byla monitorována měřením absorpce při  $\lambda = 280$  nm (modrá). Složení elučního roztoku je definováno relativním obsahem pufru B (zelená). Frakce obsahující Eqd2 jsou v chromatogramu označeny svorkou. Proteiny vybraných frakcí (v chromatogramech vyznačeny tečkou) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, NV označuje nenavázanou frakci, PM označuje promývací frakci. Gely byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa.

#### 4.2.2.2. Purifikace Eqd2 na koloně Mono Q

Jako alternativa byla testována purifikace Eqd2 na anexové koloně Mono Q s využitím pufrů o dvou různých hodnotách pH (kap. 3.2.2.2., str. 41). Na kolonu bylo naneseno 15 mg vzorku, který byl zředěn nanášecím puforem (25 mM Tris-HCl, pH 8,5 nebo 9,5) na výsledný objem 50 ml. Eluce navázaných proteinů probíhala pomocí lineárního gradientu 0 - 0,5 M NaCl a byly sbírány frakce, které byly následně analyzovány na SDS-PAGE.

Při separaci na koloně Mono Q došlo v obou případech testovaných pH k navázání Eqd2 na nosič, nicméně při pH 8,5 se Eqd2 na nosič vázal jen částečně a také oddělení absorpčních vrcholů (frakce A2 – A4) a kvalita purifikace nebyly optimální (obr. 4.6. A, str. 55). Proto bylo v následujícím kroku zvýšeno pH pro chromatografii na pH 9,5. Za těchto podmínek došlo k plné vazbě Eqd2 na nosič a eluce proběhla do několika jasně oddělených absorpčních vrcholů (frakce A2 a A3) (obr. 4.6. B, str. 55).

Separace Eqd2 na anexové koloně Mono Q při pH 9,5 se ukázala jako vhodnější. Pro zvýšení efektivity separace Eqd2 byla v další fázi použita kolona Q-Sepharose s větší kapacitou pro vazbu proteinů.

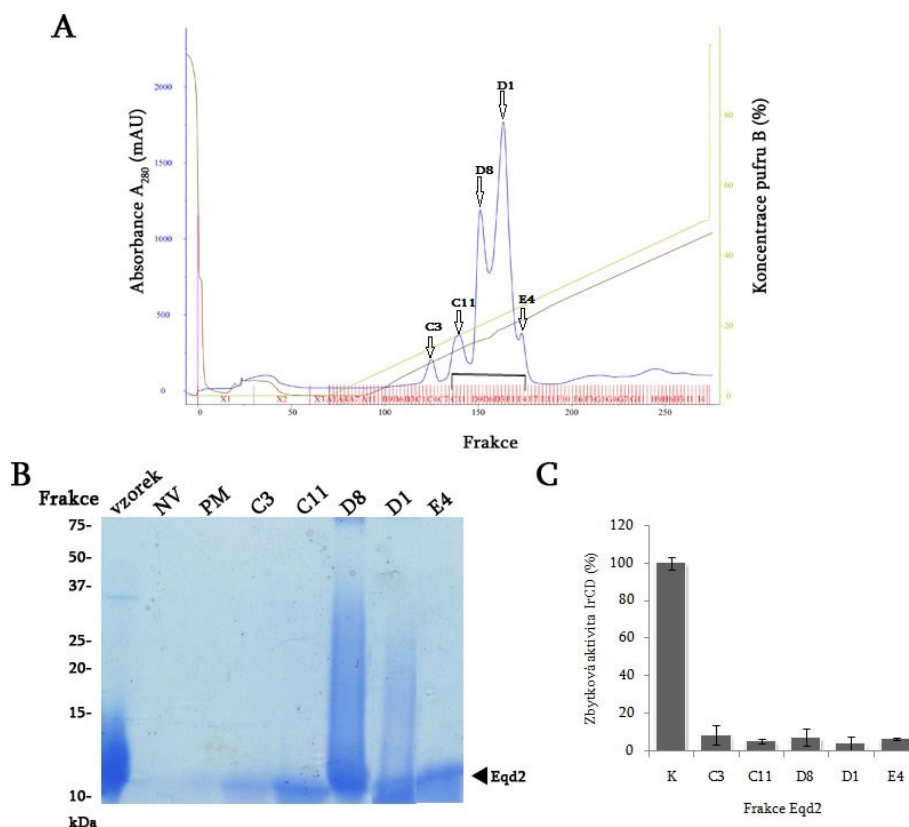


**Obr. 4.6. Separace Eqd2 na koloně Mono Q.** Chromatografie byla provedena při pH 8,5 (A) a pH 9,5 (B). Byla monitorována měřením absorbance při  $\lambda = 280$  nm (modrá). Složení elučního roztoku je definováno relativním obsahem pufru B (zelená). Frakce obsahující Eqd2 jsou v chromatogramu označeny svorkou. Proteiny vybraných frakcí (v chromatogramech vyznačeny tečkou) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, NV označuje nenávanou frakci, PM označuje promývací frakci. Gely byly obarveny pomocí stříbra (A) nebo Coomassie Brilliant Blue R-250 (B). Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa.

#### 4.2.2.3. Purifikace Eqd2 na koloně Q-Sepharose

Při optimalizaci iontoměničové separace Eqd2 byla nejvýhodnější chromatografie na anexové koloně Q-Sepharose, na které byl čištěn veškerý materiál získaný v kap. 3.2.2.2., str. 41. Na kolonu bylo naneseno 75 mg vzorku, který byl zředěn nanášecím pufrům (50 mM Tris-HCl, pH 9,5) na výsledný objem 25 ml. Eluce probíhala lineárním gradientem 0 - 0,5 M NaCl a byly sbírány frakce, které byly následně analyzovány na SDS-PAGE.

V tomto uspořádání došlo k eluci proteinů do pěti výrazných vrcholů (obr. 4.7. A), z nichž byla pro SDS-PAGE analýzu vybrány hlavní frakce (C3, C11, D8, D11 a E4). Dle SDS-PAGE analýzy byl Eqd2 eluován převážně do frakcí C11 – E4 (obr. 4.7. B). V hlavních frakcích byla dále detekována inhibiční aktivita Eqd2 v testu s katepsinem D (kap. 3.2.8.1., str. 45 a obr 4.7. C). Frakce obsahující hlavní materiál funkčního Eqd2 (C11 – E4) byly spojeny a koncentrovány na výslednou koncentraci 15 mg/ml.

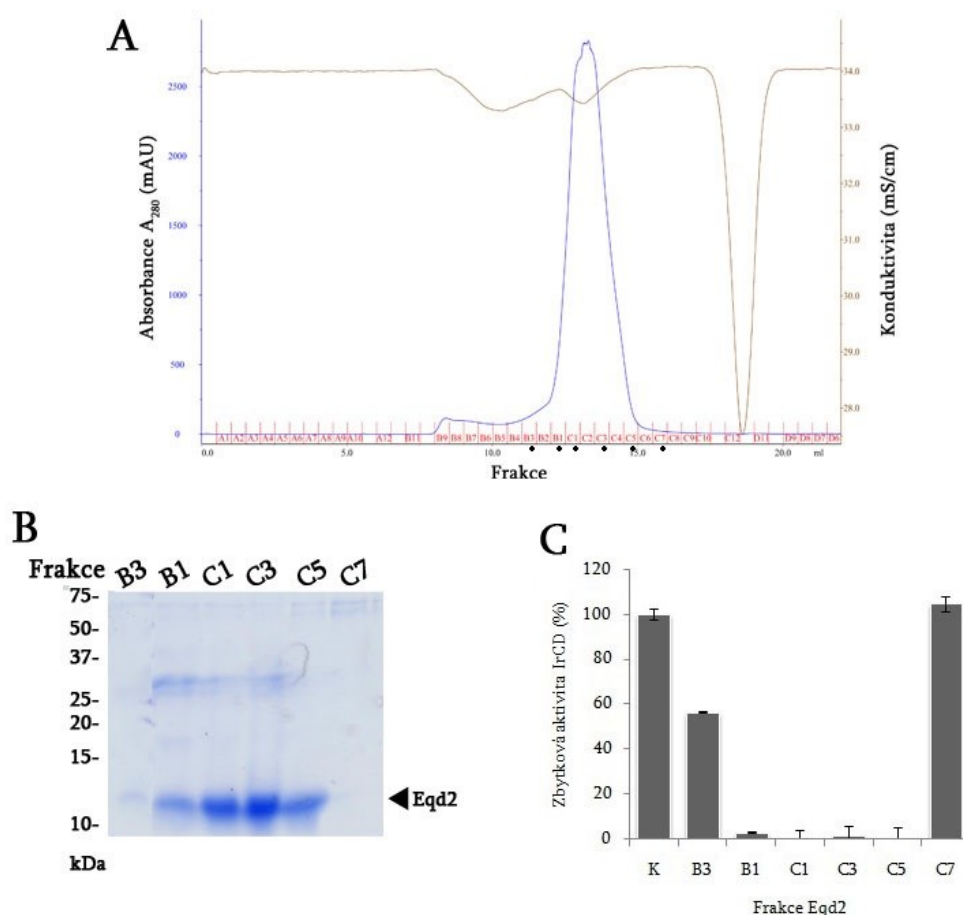


**Obr. 4.7. Separace Eqd2 na koloně Q-Sepharose.** (A) Chromatografie probíhala při pH 9,5 a byla monitorována měřením absorbance při  $\lambda = 280$  nm (modrá). Složení elučního roztoku je definováno relativním obsahem pufru B (zelená). Frakce obsahující Eqd2 jsou v chromatogramu označeny svorkou. (B) Proteiny vybraných frakcí byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, NV označuje nenavázanou frakci, PM označuje promývací frakci. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa. (C) Inhibiční potenciál vybraných frakcí byl testován v aktivním testu s katepsinem D (IrCD). Uvedena je zbytková aktivita enzymu normalizovaná na kontrolu (K), která neobsahovala inhibitor (100 %).



#### 4.2.2.4. Purifikace Eqd2 pomocí gelové chromatografie

Závěrečným krokem přípravy čistého Eqd2 byla separace na koloně Superdex 75. Na kolonu bylo nanášeno 4,5 mg vzorku v celkovém objemu 300  $\mu$ l; kolona byla ekvilibrována a eluována pomocí roztoku 0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,2. Vybrané frakce byly analyzovány na SDS-PAGE a také v nich byla změřena inhibiční aktivita v testu s katepsinem D dle kap. 3.2.8.1., str. 45 (obr. 4.8.).



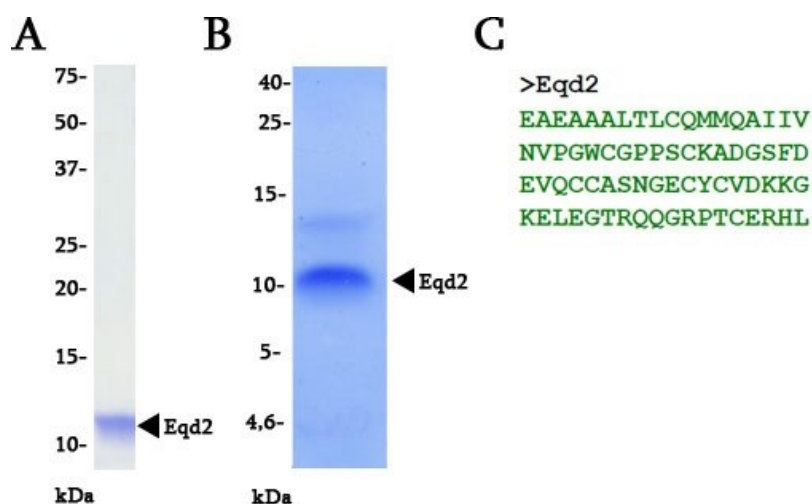
**Obr. 4.8. Separace Eqd2 na koloně Superdex 75.** (A) Chromatografie probíhala při pH 7,2 a byla monitorována měřením absorbance při  $\lambda = 280$  nm (modrá) a konduktivitou (hnědá). (B) Proteiny vybraných frakcí (vyznačeny v chromatogramu tečkou) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, který byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa. (C) Inhibiční potenciál vybraných frakcí byl testován v aktivitním testu s katepsinem D (IrCD). Uvedena je zbytková aktivita enzymu normalizovaná na kontrolu (K), která neobsahovala inhibitor (100%).

Frakce obsahující hlavní materiál funkčního Eqd2 (B1 - C5) byly zahuštěny na výslednou koncentraci 10 mg/ml a byly dále použity pro stanovení inhibice vybraných enzymů pomocí Eqd2 a pro proteinovou krystalizaci. Byla provedena aminokyselinová analýza a podle ní se roztok upravil na koncentraci 2,0 mM Eqd2.

Pomocí navrženého purifikačního postupu sady tří chromatografických kolon (obr. 4.3., str. 51) se podařilo získat Eqd2 ve vysoké čistotě. To ukazuje SDS-PAGE a tricínová SDS-PAGE (obr. 4.9. A a B, str. 59). V obou případech se Eqd2 objevuje v okolí standardu molekulové hmotnosti 10 kDa. Tricínová SDS-PAGE byla připravena v laboratoři dr. M. Mareše na ÚOCHB AV ČR M. Štajfou. Z jednoho litru expresního BMM média bylo získáno přibližně 25 mg čistého Eqd2. Tento materiál byl použit pro další biochemickou charakterizaci a krystalizaci.

U purifikovaného Eqd2 byla potvrzena počáteční aminokyselinová sekvence pomocí N-koncového sekvenování (kap. 3.2.5.4., str. 44) po přenesení proteinů elektroblotováním na PVDF membránu (obr. 4.9., str. 59). Nalezená sekvence Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Leu-Thr-Leu odpovídá sekvenci, která byla zaklonována do expresního plasmidu (obr. 4.1., str. 49).

Plné pokrytí sekvence rekombinantního Eqd2 bylo potvrzeno metodou hmotnostní spektrometrie (obr. 4.9. C, str. 59). Eqd2 byl štěpen trypsinem a peptidové štěpy byly analyzovány pomocí LC-MS/MS.



**Obr. 4.9. Analýza rekombinantního Eqd2 v purifikovaném vzorku.** Eqd2 byl analyzován pomocí SDS-PAGE (A) a tricínové SDS-PAGE (B). Gely byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa. Sekvence rekombinantního Eqd2 byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie s kompletním pokrytím (C).

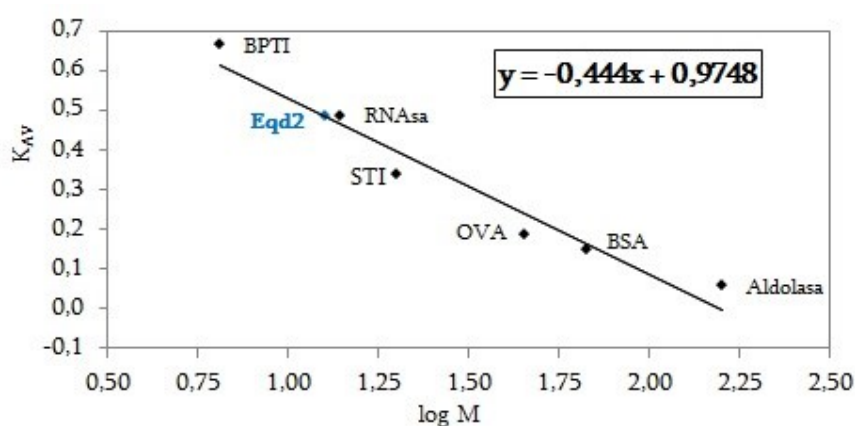
### 4.3. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2

Teoretická molekulová hmotnost rekombinantního Eqd2 je 7,5 kDa (určeno z primární sekvence Eqd2 v programu „Compute pI/MW“<sup>75</sup>), přičemž v sekvenci nemá signál pro posttranslační glykosylaci, která by molekulovou hmotnost zvyšovala. Na SDS-PAGE i tricínové SDS-PAGE migruje Eqd2 nad standardem molekulové hmotnosti 10 kDa. Proto byla analyzována molekulová hmotnost Eqd2 dalšími přesnějšími metodami: za nativních podmínek byla použita analytická gelová chromatografie a za denaturačních podmínek hmotnostní spektrometrie MALDI.

#### 4.3.1. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 gelovou chromatografií

Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 bylo provedeno pomocí analytické gelové chromatografie na koloně Superdex 75. Na kolonu byly nanášeny jednotlivé proteinové standardy o známé molekulové hmotnosti: aldolasa (160 kDa), hovězí sérový albumin (BSA; 67 kDa), ovalbumin (OVA; 45 kDa), sójový inhibitor trypsinu (STI; 20 kDa), RNAsa (14 kDa), inhibitor trypsinu z hovězí slinivky (BPTI; 6,5 kDa) (viz tab. 4.1., str.

61). Kolona byla ekvilibrována a eluována roztokem 0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,2. Z odečtených hodnot elučních objemů ( $V_e$ ) proteinových standardů byl sestaven graf závislosti  $K_{AV}$  na  $\log M$  a body byla proložena kalibrační křivka (obr. 4.10.) dle kap. 3.2.3., str. 42. Za stejných podmínek byl na kolonu nanesen purifikovaný Eqd2, který byl eluován při hodnotě  $V_e = 13,4$  ml. Ze získané kalibrační přímky byla vypočtena molekulová hmotnost Eqd2 13 kDa. Tato hodnota naznačuje, že Eqd2, jehož teoretická molekulová hmotnost je přibližně 7,5 kDa, je za daných podmínek v roztoku ve formě dimeru.



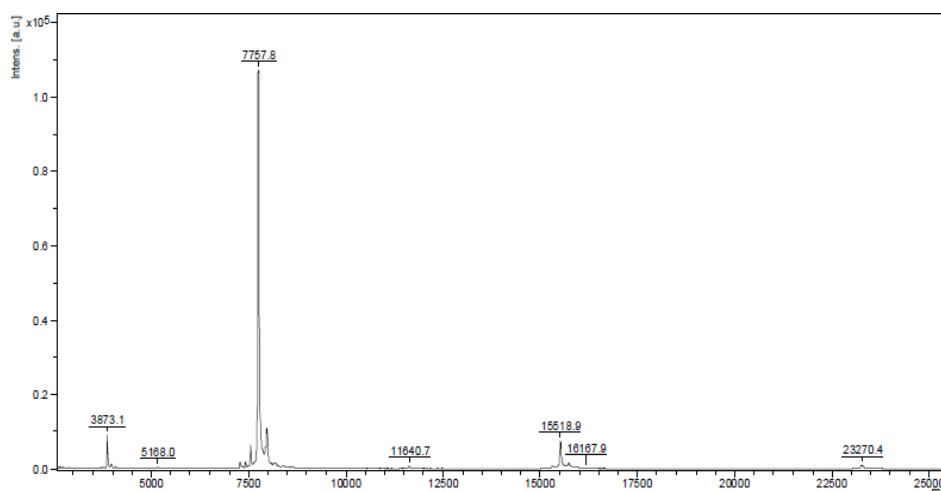
**Obr. 4.10. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 pomocí gelové chromatografie.** Kolona Superdex 75 byla kalibrována pomocí proteinů o známé molekulové hmotnosti (aldolasa, hovězí sérový albumin (BSA), ovalbumin (OVA), sójový inhibitor trypsinu (STI), RNAsa, inhibitor trypsinu z hovězí slinivky (BPTI). Eluce byla monitorována měřením absorbance při  $\lambda = 280$  nm. Do grafu jsou vyneseny hodnoty  $K_{AV}$ , které byly vypočítány ze vzorce v kap. 3.2.3., str. 42, proti hodnotě  $\log M$ . Molekulové hmotnosti jednotlivých proteinových standardů jsou uvedeny v tab. 4.1., str. 61. Rovnice kalibrační přímky je v rámečku. Pozice Eqd2 je na kalibrační přímce znázorněna modře.

**Tab. 4.1. Data pro kalibraci a analýzu gelovou chromatografií.** V tabulce jsou uvedeny molekulové hmotnosti ( $M$ ) v kDa a eluční objemy ( $V_e$ ) v ml proteinových standardů použitých pro kalibraci kolony Superdex 75. Dále je uveden eluční objem Eqd2 a jeho molekulová hmotnost vypočítaná z kalibrační křivky.

Protein	M (kDa)	$V_e$ (ml)
Aldolasa	160	8,8
BSA	67	9,8
Ovalbumin	45	10,2
STI	20	11,8
RNAse	14	13,4
BPTI	6,5	15,3
<b>Eqd2</b>	<b>13</b>	<b>13,4</b>

#### 4.3.2. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI

Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI probíhalo v servisní laboratoři dr. J. Cvačky na ÚOCHB AV ČR. Vzorek purifikovaného Eqd2 byl pro analýzu převeden do roztoku 50% acetonitrilu s 0,1% kyselinou trifluoroctovou. Hlavní vrchol na grafu MALDI-MS analýzy na obr. 4.11. má hodnotu  $m/z$  7757,8 Da. To ukazuje, že v prostředí použitých organických rozpouštědel, které lze obecně považovat za denaturační, je Eqd2 ve formě monomeru.



**Obr. 4.11. Stanovení molekulové hmotnosti Eqd2 metodou MALDI-MS.** Graf ukazuje závislost intenzity iontů na poměru  $m/z$ . Hlavní vrchol odpovídá hodnotě 7757,8 Da.

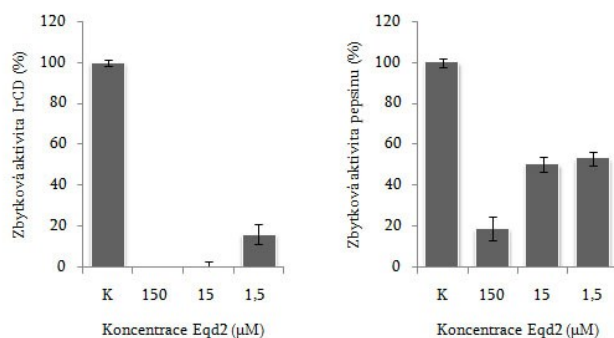
## 4.4. Analýza inhibiční specifity Eqd2

### 4.4.1. Kinetické měření inhibice vybraných enzymů s Eqd2

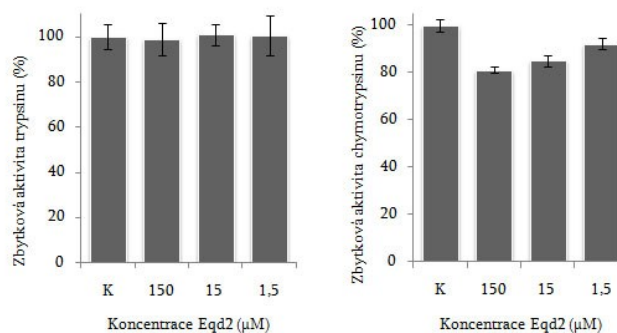
Zásobní koncentrovaný roztok purifikovaného Eqd2 (10 mg/ml) byl použit pro stanovení inhibiční aktivity s vybranými peptidasami. Měření bylo provedeno pomocí aktivitního kinetického testu s fluoregenními substráty, který je popsán v kap. 3.2.8.1., str. 45. Pro analýzu inhibice pomocí Eqd2 byli vybráni reprezentativní zástupci aspartátových peptidas (katepsin D, pepsin), cysteinových peptidas (papain, legumain) a serinových peptidas (trypsin, chymotrypsin). Měření probíhalo v mikrotitračních destičkách ve třech koncentracích inhibitoru Eqd2 (150  $\mu$ M, 15  $\mu$ M a 1,5  $\mu$ M).

Měření zbytkových aktivit peptidas v přítomnosti Eqd2 je graficky znázorněno na obr. 4.12., str. 63. Je patrné, že Eqd2 je schopen specificky inhibovat pouze zástupce aspartátových peptidas, zatímco u zástupců serinových a cysteinových peptidas nebyla pozorována inhibiční interakce. V dalším kroku probíhala detailnější měření s panelem peptidas a u zástupců citlivých k inhibici, byly stanoveny hodnoty inhibiční konstanty  $IC_{50}$ .

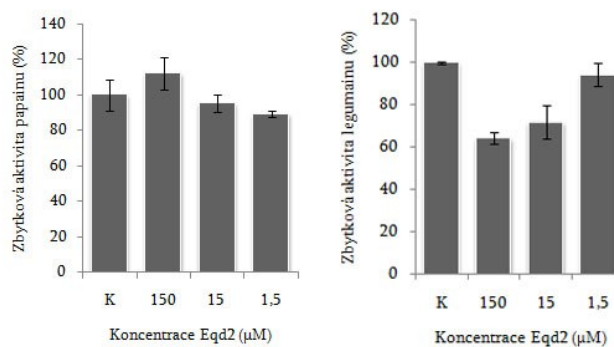
### A - Aspartátové peptidasy



### B - Serinové peptidasy



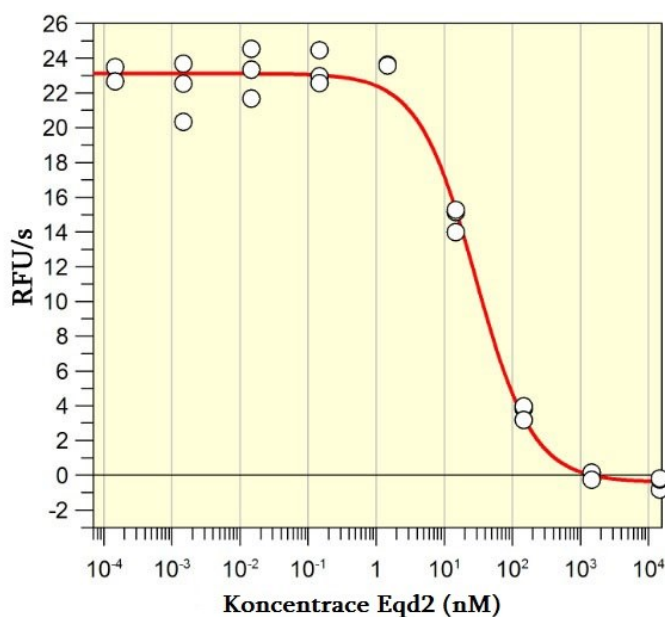
### C - Cysteinové peptidasy



**Obr. 4.12. Inhibice vybraných zástupců peptidas pomocí Eqd2.** Měření inhibice bylo provedeno v kinetickém testu s fluorogenními substráty a se třemi koncentracemi Eqd2 (1,5 - 150 μM). Testování byli zástupci aspartátových peptidas: katepsin D (IrCD) a pepsin (A), serinových peptidas: trypsin a chymotrypsin (B) a cysteinových peptidas: papain a legumain (C). Uvedena je zbytková aktivita enzymu normalizovaná na kontrolu (K), která neobsahovala inhibitor (100 %).

#### 4.4.2. Stanovení inhibiční konstanty $IC_{50}$

Inhibiční konstanta  $IC_{50}$  byla pro vybrané aspartátové peptidasy stanovena z počátečních rychlostí štěpení substrátu enzymem, který byl inhibován pomocí škály koncentrací Eqd2 (20 pM až 20  $\mu$ M). Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu GraFit a z křivky závislosti rychlosti štěpení na koncentraci Eqd2 (obr. 4.13.) byla vypočtena hodnota inhibiční konstanty  $IC_{50}$ .



**Obr. 4.13. Reprezentativní křivka určení inhibiční konstanty  $IC_{50}$  pro lidský katepsin D s Eqd2.**

*Křivka závislosti počátečních rychlostí štěpení substrátu (v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU/s)) na koncentraci Eqd2 byla připravena v programu GraFit a byla z ní vypočtena hodnota inhibiční konstanty  $IC_{50}$ .*

Inhibiční konstanty  $IC_{50}$  pro tři zástupce katepsinu D (lidský - hCD, klíštěte obecného - IrCD a mandelinky bramborové - LdCD), pro prasečí pepsin a kvasinkovou proteinasu A byly v nanomolární oblasti. Konkrétní hodnoty  $IC_{50}$  jsou shrnuty v tab. 4.2., str. 65. Dále byla testována schopnost Eqd2 inhibovat lidský renin, lidskou  $\beta$ -sekretasu a HIV proteasu. V těchto případech nebyla pozorována inhibice do koncentrace 200  $\mu$ M Eqd2. Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  byly upraveny dle koncentrace Eqd2, která byla stanovena pomocí aminokyselinové analýzy (kap. 3.2.7., str. 45).



**Tab. 4.2. Hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibici vybraných aspartátových peptidas s Eqd2.** Inhibiční parametr  $IC_{50}$  byl určen ze závislosti peptidasové aktivity na koncentraci inhibitoru v programu GraFit (obr. 4.13., str. 64). Koncentrace Eqd2 byla stanovena aminokyselinovou analýzou. Testované katepsiny D: lidský (hCD), klíště obecného (IrCD) a mandelinky bramborové (LdCD); n.i. není inhibice příslušné peptidasy do koncentrace Eqd2 200  $\mu$ M.

Peptidasa (rodina)	$IC_{50}$ (nM)
hCD (A1)	$37,5 \pm 8,8$
IrCD (A1)	$53,0 \pm 2,6$
LdCD (A1)	$21,2 \pm 6,9$
pepsin-A (A1)	$66,1 \pm 8,5$
proteinasa-A (A1)	$38,4 \pm 3,4$
renin (A1)	n. i.
$\beta$ -sekretasa (A1)	n. i.
HIV proteasa (A2)	n. i.

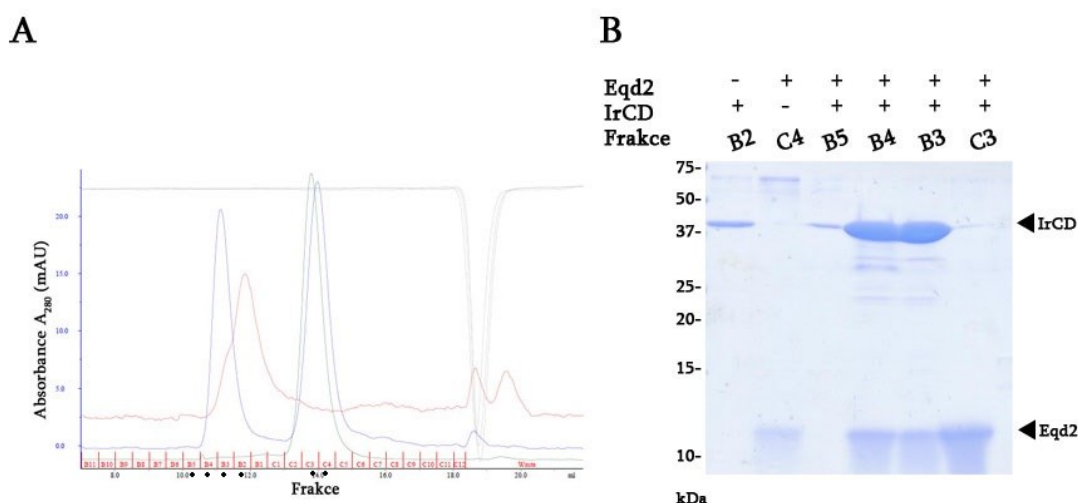
## 4.5. Příprava komplexu IrCD s Eqd2

Pro přípravu komplexu byl smíchán katepsin D (IrCD) s nadbytkem Eqd2 (v poměru 1:1,5) v pH 4,0. Směs byla separována pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75, která byla eluována pomocí 0,1 M Na-acetátu, 0,2 M NaCl, pH 4,0 (modrý chromatogram na obr. 4.14. A, str. 66). Experiment probíhal v kyselé oblasti pH s ohledem na pH oblast aktivity IrCD (pH optimum 4,2), kde byla ověřena inhibice pomocí Eqd2 v aktivitním testu (tab. 4.2) Pro určení elučních objemů jednotlivých komponent komplexu byly jako standardy použity samotný IrCD (červený chromatogram) a samotný Eqd2 (zelený chromatogram).

Z chromatografie na obr. 4.14. A, str. 66 je patrné, že za stanovených podmínek dochází k tvorbě komplexu IrCD-Eqd2 a získaný komplex je během gelové chromatografie stabilní. Chromatografický vrchol komplexu IrCD-Eqd2 (frakce B4 a B3, modrý chromatogram) má oproti vrcholu samotného IrCD (frakce B2, červený chromatogram) menší eluční objem. Eqd2 byl do komplexační směsi přidán v nadbytku oproti IrCD a nekomplexovaná frakce Eqd2 je eluována ve stejné pozici, ve které dochází k eluci samotného Eqd2 (zelený chromatogram).

Vybrané frakce z hlavních absorpčních vrcholů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 4.14. B). Při separaci komplexu IrCD-Eqd2 byly analyzovány frakce B5, B4, B3 a C3. SDS-PAGE analýza ukazuje, že první absorpční vrchol (frakce B4 a B3) obsahuje oba interakční partnery a druhý vrchol (frakce C3) pouze samotný inhibitor Eqd2, který byl do komplexační směsi přidán v nadbytku. Pro kontrolu byly na SDS-PAGE analyzovány frakce B2 z chromatografie samotného IrCD a C4 z chromatografie samotného Eqd2.

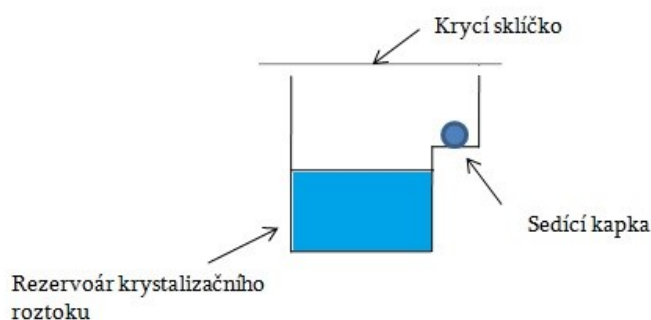
Pomocí gelové chromatografie bylo separováno 300  $\mu$ g komplexu IrCD s Eqd2, který bude dále využit pro krystalizační experimenty a rentgenostrukturní analýzu s cílem popsat interakční mechanismus Eqd2.



**Obr. 4.14. Příprava komplexu IrCD s Eqd2.** (A) K separaci byla použita gelová chromatografie na koloně Superdex 75 při pH 4,0, která byla monitorována měřením absorbance při  $\lambda = 280$  nm. Chromatogramy ukazují separaci směsi IrCD a Eqd2 (modrá), IrCD (červená) a Eqd2 (zelená). (B) Vybrané chromatografické frakce (vyznačeny tečkou) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Znaménka (+) a (-) značí přítomnost daného proteinu v separovaném vzorku. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Standardy molekulových hmotností jsou uvedeny v kDa a pozice IrCD a Eqd2 jsou vyznačeny.

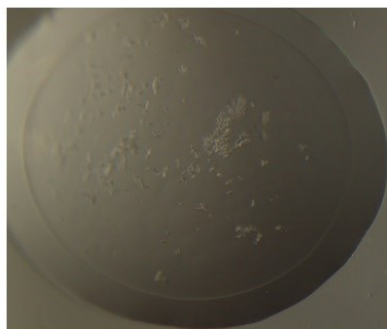
## 4.6. Krystalizace Eqd2

Purifikovaný Eqd2 (kap. 3.2.2.3., str. 42) byl koncentrován na 10 mg/ml a ve vzorku bylo upraveno složení pufru na 5 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,2. Tento roztok Eqd2 byl použit pro primární testování krystalizačních podmínek pomocí tří sad komerčních krystalizačních roztoků v 96 jamkové destičce pomocí krystalizačního robota (viz kap. 3.2.10., str. 47). Krystalizační experimenty byly provedeny metodou sedící kapky (obr. 4.15).



**Obr. 4.15. Krystalizace metodou sedící kapky.** Sedící kapka obsahuje směs proteinu s precipitačním roztokem ve vhodném poměru a má menší koncentraci precipitačního roztoku než rezervoár. Protein v kapce je pomalu zahušťován difúzí par směřující k vyrovnání koncentrací.

Po 15 dnech inkubace došlo v 12 % testovaných podmínek z celkového počtu 288 k pozorovatelným změnám ve vzhledu kapky (např. tvorba precipitace či fázové separace), zbytek zůstal bez projevu jako čiré kapky. V jedné podmínce byly pozorovatelné drobné krystalické útvary (obr. 4.16., str. 68). Složení precipitačního roztoku bylo 0,2 M  $\text{NH}_4$ -fosfát, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 50% 2-methyl-2,4-pentandiol. Tato podmínka bude dále optimalizována (změna koncentrace proteinu a krystalizačního roztoku, přidavek aditiv, atd.) za účelem získání krystalů Eqd2 s lepší morfologií, které by byly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.



**Obr. 4.16.** *Krystalizace Ecd2 metodou sedící kapky. Z 288 krystalizačních směsí byly vybrány primární krystalizační podmínky se složením precipitačního roztoku: 0,2 M  $\text{NH}_4$ -fosfát, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 50% 2-methyl-2,4-pentandiol.*

## 5. DISKUZE

Thyropiny (rodina I31 dle MEROPS<sup>76</sup>) jsou zatím málo prostudovanou skupinou peptidasových inhibitorů proteinového charakteru. Ve své primární struktuře obsahují sekvenční motiv thyreoglobulinové domény typu 1<sup>56</sup>. Tyto inhibitory jsou typicky cíleny na regulaci cysteinových peptidas (z papainové rodiny C1). Výjimku představuje equistatin ze sasanky koňské (*Actinia equina*), který má unikátní vlastnost inhibovat kromě cysteinových peptidas i aspartátové peptidasy<sup>63,77</sup>. Equistatin je složen ze tří homologických domén thyropinového typu, z nichž doména 2 (Eqd2) je zodpovědná za inhibici aspartátových peptidas<sup>55,65</sup>. Předkládaná diplomová práce se zabývala touto doménou Eqd2. Doposud byly identifikovány pouze čtyři jiné přírodní inhibitory aspartátových peptidas proteinového charakteru. Reaktivní centrum bylo strukturně popsáno pro dva z nich a vždy využívalo odlišné inhibiční mechanismy pro interakci s enzymem (viz tab. 1.2., str. 29).

Cílem diplomové práce bylo získat dostatečné množství čistého Eqd2 a biochemicky ho charakterizovat. Za tímto účelem byl připraven rekombinantní Eqd2 v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris* a byl vyvinut protokol pro jeho víceetapovou chromatografickou purifikaci. Výtěžek čistého Eqd2 byl 25 mg z 1 litru expresního média. Srovnatelné množství bylo získáno v předchozích studiích popsaných v literatuře, které se zabývaly expresí celého equistatinu i jeho domén<sup>65,67</sup>. Řádového zvýšení produkce proteinu bylo dosaženo optimalizací expresního konstruktu<sup>78</sup>.

Předchozí biochemická analýza ukázala, že equistatin jako celek je schopen inhibovat cysteinové peptidasy typu papainu a aspartátovou peptidasu katepsin D<sup>55</sup>. Inhibiční konstanta pro katepsin D s celým equistatinem i samotnou doménou Eqd2<sup>65</sup> byla nalezena v subnanomolární oblasti. V této diplomové práci byla detailně analyzována inhibiční specifita Eqd2 se sadou modelových peptidas. Ukázalo se, že doména Eqd2 je schopna inhibovat kromě katepsinu D i další peptidasy z rodiny A1, konkrétně pepsin a proteinasu A a to s obdobnými hodnotami inhibičního parametru

IC<sub>50</sub> v nanomolární oblasti. Naproti tomu ostatní testované aspartátové peptidasy z rodiny A1 (renin,  $\beta$ -sekretasa) a z rodiny A2 (HIV proteasa) nebyly inhibovány, stejně jako modelové enzymy ze třídy cysteinových a serinových peptidas. Rozdíl mezi dříve publikovanými inhibičními konstantami pro katepsin D a získanými v této práci by mohl být způsoben: (1) uspořádáním inhibičního enzymologického testu (odlišný substrát, pH, atd.); (2) drobnými rozdíly v sekvenci Eqd2 (terminální peptidové extenze spojené s použitím odlišných plasmidů); (3) dimerizací rekombinantního Eqd2 v roztoku, která byla v této práci poprvé pozorována. Molekulová hmotnost Eqd2 byla stanovena za nativních a denaturačních podmínek. Při nativní analytické gelové chromatografii se Eqd2 choval jako dimer, zatímco hmotnostní spektrometrie metodou MALDI potvrdila, že je Eqd2 za denaturačních podmínek regulérním monomermem.

Dále se tato diplomová práce zabývala primární analýzou krystalizačních podmínek pro rekombinantní Eqd2. Byla nalezena vhodná podmínka pro budoucí optimalizaci, díky které bude možné získat krystaly Eqd2 pro rentgenostrukturní analýzu. Dosud bylo k dispozici jen velmi málo strukturních informací o inhibitech z thyropinové rodiny. V databázi PDB („Protein data bank“) jsou dostupné pouze struktury pro inhibitor p41 (isoforma invariantního řetězce, který se váže na MHC glykoproteiny II. třídy). Metodou NMR byla vyřešena struktura samotného p41 (PDB: 1L34)<sup>79</sup> a pomocí krystalografie byla určena struktura p41 v komplexu s cysteinovou peptidasou katepsinem L (PDB: 1ICF)<sup>80</sup>. Krystalizační podmínky pro Eqd2 prezentované v této práci představují nezbytná data pro určení jeho 3D struktury, která významně rozšíří informace o architektuře a strukturní variabilitě inhibitorů thyropinové rodiny.

Dále byl připraven komplex Eqd2 s katepsinem D, který umožní budoucí krystalografickou analýzu za účelem určení nového inhibičního mechanismu pro aspartátové peptidasy. Tento mechanismus by mohl být využit k racionálnímu navrhování syntetických mimetik pro regulaci medicíně významných aspartátových peptidas, které jsou spojované s řadou patologií a představují molekulární cíle pro inhibiční chemoterapeutika.

Významným výsledkem práce je potvrzení účinné inhibiční interakce mezi Eqd2 a trávicím katepsinem D z mandelinky bramborové (LdCD)<sup>70,81</sup>. Na modelovém systému rostlina – herbivor (lilek brambor - mandelinka bramborová) bylo již dříve prokázáno, že equistatin má insekticidní účinky. Nebyla však detailně studována interakce s cílovými trávicími peptidasami mandelinky<sup>69,71</sup>. V diplomové práci je podán první přímý důkaz o inhibici LdCD pomocí Eqd2 a ten se tak stává potenciálním transgenem pro konstrukci transgenních plodin odolných proti hmyzím škůdcům.

## 6. ZÁVĚRY

Diplomová práce se zabývala equistatinem ze sasanky koňské (*A. equina*), který je peptidasovým inhibitorem z málo prozkoumané rodiny thyropinů. Pozornost se soustředila na proteinovou doménu Eqd2, která patří mezi několik unikátních přirozených inhibitorů aspartátových peptidas.

Hlavní výsledky diplomové práce jsou následující:

- Eqd2 byl připraven rekombinantní expresí v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris*. Pro jeho purifikaci byl vyvinut několikastupňový chromatografický protokol. Identita Eqd2 byla potvrzena hmotnostní spektrometrií a N-koncovým sekvenováním.
- Rekombinantní Eqd2 byl analyzován ve fluorescenčním inhibičním testu s vybranými zástupci aspartátových, cysteinových a serinových peptidas a byly určeny hodnoty parametru IC<sub>50</sub>. Tyto výsledky ukázaly, že Eqd2 je vysoce specifický inhibitor pro peptidasu typu katepsinu D a pepsinu z rodiny aspartátových peptidas A1.
- Funkční interakce Eqd2 s katepsinem D byla prokázána tvorbou komplexu, který byl detekován pomocí analytické gelové chromatografie.
- Analýza molekulové hmotnosti rekombinantního Eqd2 za nativních a denaturačních podmínek naznačuje, že molekula Eqd2 je schopná dimerizovat.
- Byla provedena primární analýza krystalizačních podmínek s Eqd2 a byl vybrán vhodný krystalizační roztok pro budoucí optimalizaci krystalu za účelem jeho rentgenostrukturní analýzy.

Tato práce přináší nové významné informace o Eqd2 jako novém strukturním typu přirozených inhibitorů aspartátových peptidas. Detailní popis interakčního mechanismu Eqd2 umožní v dalším období navrhovat syntetická inhibiční mimetika pro regulaci medicínálně významných aspartátových peptidas.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Dickinson, D. P. Salivary (SD-type) cystatins. *Crit. Rev. oral Biol. Med.* **13**, 485–508 (2002).
2. Barrett, A. J. & McDonald, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* **237**, 935 (1986).
3. Turk, B. Targeting proteases - successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799 (2006).
4. MEROPS: the peptidase database. Available at: [http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family\\_index?type=P#N](http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P#N). (Staženo: 16.3.2017)
5. Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M. & Lopez-Otin, C. Human and mouse proteases. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544–558 (2003).
6. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **32**, 160–164 (2004).
7. Athauda, S. B., Inoue, H., Iwamatsu, A. & Takahashi, K. Acid proteinase from *Nepenthes distillatoria* (Badura). *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**, 453–458 (1998).
8. Ramalho-Santos, M., Verissimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Beeumen, J. V., Pires, E. & Faro, C. Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur. J. Biochem.* **255**, 133–138 (1998).
9. Cooper, J. B. Aspartic Proteinases in Disease: A Structural Perspective. *Current Drug Targets* **3**, 155–173 (2002).
10. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Salvesen, G. & Woessner, J. F. *Handbook of proteolytic enzymes*. (Academic Press, 2013).
11. Fusek, M. & Větvička, V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech repub* **149**, 43–50 (2005).
12. Tang, J., James, M. N., Hsu, I. N., Jenkins, J. A. & Blundell, T. L. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* **271**, 618–621 (1978).
13. Fortenberry, S. C., Schorey, J. S. & Chirgwin, J. M. Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J. Cell Sci.* **108**, 2001–2006 (1995).
14. Yasuda, Y., Ikeda, S., Sakai, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Nishishita, K., Akamine, A., Kato, Y. & Yamamoto, K. Role of N-glycosylation in cathepsin E A comparative study of cathepsin E with distinct N-linked oligosaccharides and its nonglycosylated mutant. *FEBS* **266**, 383–391 (1999).

15. Cooper, J. . B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I. J. & Blundell, T. L. X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimendional strucutre of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **214**, 199–222 (1990).
16. Baldwin, E. T., Narayana Bhat, T., Gullnik, S., Hosur, M. V., Sowder, R. C., Cachau, R. E., Collins, J., Silva, A. M. & Erickson, J. W. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 6796–6800 (1993).
17. Sielecki, A. R., Hayakawa, K., Fujinaga, M., Murphy, M. E., Fraser, M., Muir, A. K., Carilli, C. T., Lewicki, J. A., Baxter, J. D. & James, M. N. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science*. **243**, 1346–1351 (1989).
18. Rahuel, J., Priestle, J. P. & Grutter, M. G. The crystal structures of recombinant glycosylated human renin alone and in complex with a transition state analog inhibitor. *J. Struct. Biol.* **107**, 227–236 (1991).
19. Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J. K., Leis, J. & Wlodawer, A. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* **337**, 576–579 (1989).
20. Dunn, B. M. & Hung, S. The two sides of enzyme–substrate specificity. *Biochim. Biophys. acta. Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 231–240 (2000).
21. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry*. (Wiley, 2004).
22. Coates, L., Tuan, H., Tomanicek, S., Kovalevsky, A., Mustyakimov, M., Erskine, P. & Cooper, J. The Catalytic Mechanism of an Aspartic Proteinase Explored with Neutron and X-ray Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7235–7237 (2008).
23. Northrop, D. B. Follow the Protons: A Low-Barrier Hydrogen Bond Unifies the Mechanisms of the Aspartic Proteases. *Accounst Chem. Res.* **34**, 790–797 (2001).
24. Turk, B., Turk, D. & Salvesen, G. S. Regulating Cysteine Protease Activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1623–1637 (2002).
25. Bode, W. & Huber, R. Structural basis of the endoproteinase–protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. acta. Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 241–252 (2000).
26. Wiederanders, B., Kaulmann, G. & Schilling, K. Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr. protein Pept. Sci.* **4**, 309–326 (2003).
27. Horn, M., Jílková, A., Vondrášek, J., Marešová, L., Caffrey, C. R. & Mareš, M. Mapping the pro-peptide of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: Modulation of inhibition by heparin and design of mimetic inhibitors. *ACS*

- Chem. Biol.* **6**, 609–617 (2011).
28. Máša, M., Marešová, L., Vondrášek, J., Horn, M., Ježek, J. & Mareš, M. Cathepsin D Propeptide: Mechanism and Regulation of Its Interaction with the catalytic core. *Biochemistry* **45**, 15474–15482 (2006).
  29. Minarowska, A., Gacko, M., Karwowska, A. & Minarowski, L. Human cathepsin D. *Folia Histochem. Cytobiol.* **46**, 23–38 (2008).
  30. Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. & Figura, K. Biosynthesis and Transport of Cathepsin D in Cultured Human Fibroblasts. *J. Cell Biol.* **97**, 1–5 (1983).
  31. Kornfeld, S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 367–374 (1989).
  32. Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S. & Kalbacher, H. Cathepsin D : A cellular roadmap. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 5–9 (2008).
  33. Figura, K. von, Gieselmann, V. & Hasilik, A. Processing of Human Cathepsin D in Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 3215–3220 (1985).
  34. Garreau, I., Cucumel, K., Dagouassat, N., Zhao, Q., Cupo, A. & Piot, J. M. Hemorphin Peptides are Released from Hemoglobin by Cathepsin D . Radioimmunoassay Against the C-part of V-V-hemorphin-7 : An Alternative Assay for the Cathepsin D Activity. *Peptides* **18**, 293–300 (1997).
  35. Fruitier, I., Garreau, I. & Piot, J. M. Cathepsin D Is a Good Candidate for the Specific Release of a Stable Hemorphin from Hemoglobin In Vivo : VV-Hemorphin-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 719–724 (1998).
  36. Nussbaumerová, M., Srp, J., Máša, M., Hradilek, M., Šanda, M., Reiniš, M., Horn, M. & Mareš, M. Single- and Double-Headed Chemical Probes for Detection of Active Cathepsin D in a Cancer Cell Proteome. *ChemBioChem* **11**, 1538–1541 (2010).
  37. Ferrandina, G., Scambia, G., Bardelli, F., Panici, P. B., Mancuso, S. & Messori, A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patient: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* **76**, 661–666 (1997).
  38. Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondou-Lassis, M., Laurenth-Matha, V., Prébois, C., Rochefort, H. & Vignon, F. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer* **237**, 167–179 (2006).
  39. Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J. & Venkanteshan, P. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* **10**, 506–511 (2014).
  40. Vashishta, A., Fusek, M. & Větvíčka, V. Possible Role of Procathepsin D in

- Human Cancer. *Folia Microbiol. (Praha)*. **50**, 71–76 (2005).
41. Wise, L. A., Titus-Ernstoff, L., Newcomb, P. A., Trentham-Dietz, A., Trichopoulos, D., Hampton, J. M. & Egan, K. M. Exposure to breast milk in infancy and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **20**, 1083–1090 (2009).
  42. Beneš, P., Větvička, V. & Fusek, M. Cathepsin D — Many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **68**, 12–28 (2008).
  43. Srp, J. & Mareš, M. Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin: strukturní a funkční diverzita. *Chem. List.* **110**, 1–8 (2016).
  44. Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishjma, H. & Takeuchi, T. Effect of pepstatin on acid proteases. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **24**, 687–694 (1971).
  45. Conner, G. E. Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. Autocatalytic proteolysis of the zymogen form of the enzyme. *Biochem. J.* **263**, 601–604 (1989).
  46. Majer, P., Collins, J. R., Gulnik, S. V. & Erickson, J. W. Structure-based subsite specificity mapping of human cathepsin D using statine-based inhibitors. *Protein Sci.* **6**, 1458–1466 (1997).
  47. Gacko, M. Cathepsin D inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, 291–313 (2007).
  48. Lin, T. Y. & Williams, H. R. Inhibition of Cathepsin D by Synthetic Oligopeptides. *J. Biol. Chem.* **254**, 11875–11883 (1979).
  49. Fujinaga, M., Chernaia, M. M., Tarasova, N. I., Mosimann, S. C. & James, M. N. G. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci.* **4**, 960–972 (1995).
  50. Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodaawer, A., Kay, J. & Gustchina, A. The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 113–117 (2000).
  51. Ng, K. K., Petersen, J. F., Cherney, M. M., Garen, C., Zalatoris, J. J., Rao-Naik, C., Dunn, B. M., Martzen, M. R., Peanasky, R. J. & James, M. N. Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 653–657 (2000).
  52. Dash, C. Structural and Mechanistic Insight into the Inhibition of Aspartic Proteases by a Slow-Tight Binding Inhibitor from an Extremophilic *Bacillus* sp. *Biochemistry* **40**, 11525–11532 (2001).
  53. Christeller, J. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* **254**, 160–167 (1998).

54. Mareš, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V. & Baudyg, M. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* **25**, 94–98 (1989).
55. Turk, V. Thyroglobulin Type-1 Domains in Equistatin Inhibit Both Papain-like Cysteine Proteinases and Cathepsin D \*. *J. Biol. Chem.* **274**, 563–566 (1999).
56. Lenarčič, B. & Bevec, T. Thyropins - new structurally related proteinase inhibitors. *Biol. Chem.* **379**, 105–111 (1998).
57. Molina, F., Bouanani, M., Pau, B. & Granier, C. Characterization of the type-1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families. *Eur. J. Biochem.* **240**, 125–133 (1996).
58. McKnight, A. J., Mason, D. W. & Barclay, A. N. Sequence of a rat MHC class II-associated invariant chain cDNA clone containing a 64 amino acid thyroglobulin-like domain. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3983–3984 (1989).
59. Fineschi, B. & Miller, J. Endosomal proteases and antigen processing. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 377–382 (1997).
60. Malthiéry, Y. & Lissitzky, S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.* **165**, 491–8 (1987).
61. Molina, F., Pau, B. & Granier, C. The type-1 repeats of thyroglobulin regulate thyroglobulin degradation and T3, T4 release in thyrocytes. *FEBS Lett.* **391**, 229–231 (1996).
62. Lenarčič, B., Ritonja, A., Strukelj, B., Turk, B. & Turk, V. Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 13899–13903 (1997).
63. Strukelj, B., Lenarcic, B., Gruden, K., Pungercar, J., Rogelj, B., Turk, V., Bosch, D. & Jongsma, M. A. Equistatin, a protease inhibitor from the sea anemone *actinia equina*, is composed of three structural and functional domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 732–6 (2000).
64. *Actinia equina*. Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinia\\_equina2.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinia_equina2.JPG). (Staženo: 18.3. 2017)
65. Galeša, K., Pain, R., Jongsma, M. A., Turk, V. & Lenarčič, B. Structural characterization of thyroglobulin type-1 domains of equistatin. *FEBS Lett.* **539**, 120–124 (2003).
66. Stoka, V., Lenarčič, B., Cazzulo, J. J. & Turk, V. Cathepsin S and Cruzipain Are Inhibited by Equistatin from *Actinia equina*. *Biol. Chem.* **380**, 589–592 (1999).

67. Rogelj, B., Strukelj, B., Bosch, D. & Jongsma, M. A. Expression, purification, and characterization of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **19**, 329–334 (2000).
68. Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I. & Turk, V. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J. Exp. Med.* **183**, 1331–8 (1996).
69. Gruden, K., Štrukelj, B., Popovič, T., Lenarčič, B., Bevec, T., Brzin, J., Kregar, I., Herzog-Velikonja, J., Stiekema, W. J., Bosch, D. & Jongsma, M. A. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 549–560 (1998).
70. Srp, J., Nussbaumerová, M., Horn, M. & Mareš, M. Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multiproteidase network. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **78**, 1–11 (2016).
71. Outchkourov, N. S., Rogelj, B., Strukelj, B. & Jongsma, M. A. Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol.* **133**, 379–90 (2003).
72. Invitrogen™. EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. (2010).
73. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
74. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99 (1987).
75. ExPASy. Available at: [http://web.expasy.org/compute\\_pi/?\\_ga=2.230473372.189866010.1493882979-333391134.1493882974](http://web.expasy.org/compute_pi/?_ga=2.230473372.189866010.1493882979-333391134.1493882974). (Staženo: 4.5.2017)
76. Peptidase inhibitors. Available at: <http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors/index.shtml>. (Staženo: 16.3.2017)
77. Mihelič, M. & Turk, D. Two decades of thyroglobulin type-1 domain research. *Biol. Chem.* **388**, 1123–1130 (2007).
78. Outchkourov, N. S., Stiekema, W. J. & Jongsma, M. A. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **24**, 18–24 (2002).
79. Chiva, C., Barthe, P., Codina, A., Gairi, M., Molina, F., Granier, C., Pugniere, M., Inui, T., Nishio, H., Nishiuchi, Y., Sakakibara, S., Kimura, T., Albericio, F. & Giralt, E. Synthesis and NMR Structure of P41icf, a Potent Inhibitor of Human Cathepsin L. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1508–1517 (2003).

80. Gunčar, G., Pungerčič, G., Klemenčič, I., Turk, V. & Turk, D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* **18**, 793–803 (1999).
81. Brunelle, F., Nguyen-Quoc, B., Cloutier, C. & Michaud, D. Protein Hydrolysis by Colorado Potato Beetle , *Leptinotarsa decemlineata* , Digestive Proteases : The Catalytic Role of Cathepsin D. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **98**, 88–98 (1999).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka